

# 苞叶姜的 nrDNA ITS2 和 cpDNA psbB-H 序列 分子进化特点的分析

李 聪<sup>1</sup>, 王英强<sup>1,2\*</sup>

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631;

2. 华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州 510631)

**摘 要:** 采用改良的 CTAB 法从硅胶干燥的苞叶姜 (*Pyrgophyllum yunnanense*) 叶片中提取总 DNA, 对 nrDNA ITS2 和 cpDNA psbB-H 区域进行 PCR 扩增、测序和序列分析, 初步研究 2 套植物基因组的变异速率。nrDNA ITS2 序列长 224 bp, 有变异位点 3 处, 变异位点百分率为 1.339%, (G+C) 含量为 60.7%。cpDNA psbB-H 序列长 623~625 bp, 有 2 个碱基插入缺失, 变异位点 8 处, 变异位点百分率 1.284%, (G+C) 含量为 33.9%, cpDNA 核苷酸多态性 (0.00551) 比 nrDNA (0.00295) 高。苞叶姜的这 2 个片段, 变异速率相近, 遗传分化指数相同 ( $F_{st}=1.000$ ), 居群间高度分化。ITS2 序列和 psbB-H 序列单倍型中性检验结果一致, 表明苞叶姜居群处于长期稳定状态。psbB-H 错配分布 (Mismatch-distribution) 分析, 表示苞叶姜的现有分布范围近期可能经历了居群扩张。因此, 苞叶姜的谱系地理学研究可结合 nrDNA ITS2 序列和 cpDNA psbB-H 序列来分析。

**关键词:** 苞叶姜; ITS2 序列; psbB-H 序列

中图分类号: Q946.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)05-0852-05

## Characterizing molecular evolution of *Pyrgophyllum yunnanense* (Zingiberaceae) based on nrDNA ITS2 and cpDNA psbB-H sequence analysis

LI Cong<sup>1</sup>, WANG Yingqiang<sup>1,2</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631; 2. Key Laboratory of Ecology and Environment Science in Guangdong Higher Education, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631)

**Abstract:** Using total DNA extracted from silica-dried leaves of *Pyrgophyllum yunnanense* using modified CTAB method, the nrDNA ITS2 and cpDNA psbB-H regions were amplified and sequenced. Differences between the nrDNA ITS2 and cpDNA psbB-H sequences in *Pyrgophyllum yunnanense* were analyzed. The length of ITS2 sequence of *Pyrgophyllum yunnanense* was 224 bp, of which three variable sites with a 1.339% rate were observed. The (G+C) content was 60.7%. The length of psbB-H sequence of *Pyrgophyllum yunnanense* was 623-625 bp, of which eight variable sites with a 1.284% rate were observed. The (G+C) content was 33.9%. The evolutionary rate of the ITS2 and psbB-H regions in *Pyrgophyllum yunnanense* was similar. The fixation index ( $F_{st}=1.000$ ) indicated high population genetic differentiation. The neutrality test values showed the populations of *Pyrgophyllum yunnanense* had been stable for a long time. The test of mismatch distribution using cpDNA genome showed that the populations in the entire geographical region had undergone recent range expansion. We suggested using nrDNA ITS2 and psbB-H sequences of *Pyrgophyllum yunnanense* to investigate the phylogeographic study of this specie.

**Key words:** *Pyrgophyllum yunnanense*; ITS2 sequence; psbB-H sequence

收稿日期: 2017-02-14

基金项目: 国家自然科学基金委-广东省联合基金重点支持项目 (U1301213), 广东省自然科学基金重点项目 (7117864) 和高等学校全国优秀博士学位论文作者专项 (2007B26) 共同资助。

作者简介: 李 聪, 硕士研究生。E-mail: Leecxueshu@126.com

\* 通信作者: 王英强, 教授, 博士生导师。E-mail: wangyq@scnu.edu.cn

苞叶姜 (*Pyrgophyllum yunnanense*) 是姜科单种属苞叶姜属 (*Pyrgophyllum*) 一种多年生草本植物, 中国特有种, 生长于海拔 1 300~2 800 m 的疏林草丛和灌木丛或山地密林下<sup>[1]</sup>。苞叶姜主要分布于中国的四川中南部和云南中北地区的云南高原和横断山区<sup>[2]</sup>。目前对苞叶姜的研究多集中在形态解剖和胚胎学方面<sup>[3-4]</sup>, 对其 DNA 序列的研究较少。

随着分子生物学技术的快速发展, 核糖体 DNA 的 ITS 序列非编码区、叶绿体 DNA 序列的编码区及非编码区广泛应用于植物的分子系统学和谱系地理学研究中<sup>[5]</sup>。在被子植物中, ITS 区域既具有核苷酸序列的高度变异性又有长度上的保守性, 常被用来分析植物较低分类单元的系统发育关系<sup>[6]</sup>。ITS2 是 ITS 序列里的内转录间隔区, 是进化速度较快的区域。cpDNA 基因间隔区是位于 cpDNA 上的一段单拷贝序列, 被广泛用于植物谱系地理研究<sup>[7-8]</sup>。目前对植物谱系地理的研究主要集中在 cpDNA 分子标记, 而将 nrDNA 与 cpDNA 结合分析的较少。

本研究通过对苞叶姜 14 个居群 135 个体的 nrDNA ITS2 序列和 cpDNA psbB-H 基因间隔区序列进行分析, 比较 2 套基因组序列的分子特点和进化情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究样本材料涵盖苞叶姜 (*Pyrgophyllum yunnanense*) 所有的分布地区, 包括云南省的维西、鹤庆松桂、宾川、丽江束河、永胜、大理蝴蝶泉、漾濞、安宁、嵩明、华宁和丘北 11 个居群, 四川省泸定、木里和攀枝花普威 3 个居群, 共 14 个居群 135 个体。每个居群 5~10 个个体, 每个体采样地点间隔 5 m 以上。从各地采取的新鲜叶片, 用硅胶快速干燥, 常温保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 提取基因组 DNA** 用改良 CTAB 法<sup>[9]</sup>提取苞叶姜基因组 DNA。取 0.02 g 干燥叶片, 加入液氮研磨成粉, 放入加有 800  $\mu$ L 预处理液 (250 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl [pH 8.0], 50 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 250 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 2%  $\beta$ -巯基乙醇, 2%~5% PVP) 的 1.5 ml 离心管中, 震荡混匀, 放置在 -20°C, 10 min 后取出, 放入离心机 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 15 min, 弃上清液。迅速加入 2×CTAB 提取液 (100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl [pH 8.0], 100 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1 400 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl) 800  $\mu$ L, 震荡混匀。放入 65°C 水浴锅 1 h, 每隔 15 min 翻转 1 次。取出离心管, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,

将上清液转至新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1) 缓慢颠倒 5 min, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 吸上层水相转入新的 1.5 mL 离心管中。加入 1/3 体积的 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 等体积的无水乙醇, 放入 -20°C 冰箱中沉淀 2 h。12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后弃上清液, 收集沉淀, 加 500  $\mu$ L 70% 的乙醇清洗沉淀, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后弃上清液, 自然风干 20 min 后, 加 30  $\mu$ L 灭菌水溶解。用质量浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

**1.2.2 nrDNA ITS2 序列和 cpDNA psbB-H 序列的 PCR 扩增和测序** 采用通用引物和实验室设计的引物扩增, nrDNA ITS2 序列 (F: 5' -TCCTCCGCTTATTGATA-TGC-3' 和 R: 5' -GCATCGATGAAGAACGCA GC-3'); cpDNA psbB-H 序列 (F: 5' -GTTTACTTTTGGGCAT-GCTTCG-3' 和 R: 5' -CGCAGTTTCGTCTTGACCAG-3')。PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L 的反应体积, 其中含 32 ng DNA, 10×PCR buffer 2.0  $\mu$ L, 1.2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol· $\mu$ L<sup>-1</sup>), 2.0  $\mu$ L dNTPs (2.5 mmol· $\mu$ L<sup>-1</sup>), 每对引物浓度 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, TaqDNA 聚合酶 1.5 U (TaKaRa)。扩增反应在 BIO-RAD PTC-200 PCR 仪上进行。ITS2 扩增程序为: 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 45 s, 56°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1.5 min, 进行 39 个循环, 最后 72°C 延伸 8 min。psbB-H 扩增程序为: 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 45 s, 57°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1.5 min, 进行 39 个循环, 最后 72°C 延伸 8 min。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物检测。PCR 产物由华大基因公司进行双向测序。

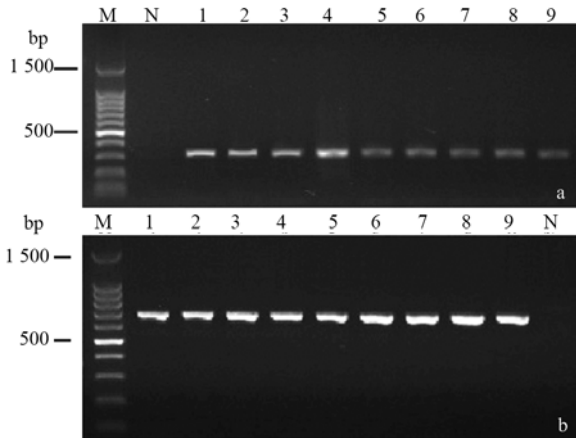
**1.2.3 数据处理** 序列用 ClustalX1.81<sup>[10]</sup>进行序列比对, 对产生变异的序列进行二次测序, 确定可靠的变异位点, 用软件 BioEdit<sup>[11]</sup>对序列进行人工校对, 并切除首尾参差部分。用 MEGA 5.05<sup>[12]</sup>软件进行核苷酸组成分析。用 DnaSP 程序<sup>[13]</sup>计算核苷酸多态性、变异位点百分率及单倍型类型; 通过 Tajima 的 D 检验<sup>[14]</sup>, Fu 和 Li 的 D 中性检验<sup>[15]</sup>, 以及进行错配分布 (Mismatch distribution) 分析, 检验种群近期是否经历过居群范围的扩张事件。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列的 PCR 扩增结果

PCR 扩增体系对各居群苞叶姜 nrDNA ITS2 和 cpDNA psbB-H 片段进行扩增, 电泳得到单一条带 (图 1), 扩增条带清晰, 无拖带和非特异性条带, 扩增结果良好。将测序结果在 NCBI 网站 BLAST 比对 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 确定

为目的条带。



M.DNA Marker; 1~9.PCR 产物片段; N.阴性对照  
 M.DNA Marker;1-9. Partial fragment; N. Negative control

图 1 nrDNA ITS2 (a)和 cpDNA psbB-H(b)PCR 产物电泳图  
 Figure 1 The electrophoresis pattern of PCR amplification on ITS2(a) and cpDNA psbB-H(b)

2.2 苞叶姜各居群 nrDNA ITS2 序列分析

对苞叶姜 135 个体 nrDNA ITS2 序列进行测序，

经过处理得到序列长度为 224 bp，没有碱基的插入或缺失（图 2a）。ITS2 序列中，共有保守位点 221 个，简约信息位点数 1 个，变异位点 3 个，其中 132 bp 位点处为 A-G 转换，125 bp 和 138 bp 位点处分别为 G-C 颠换和 A-C 颠换。转换/颠换比值为 0.26，表明序列的变异主要来源于颠换。nrDNA ITS2 区域序列的变异位点百分率为 1.34%，核苷酸多态性  $\pi$  为 0.00295。所得序列碱基组成的平均值为 T 占 13.4%，C 占 35.8%，A 占 26.0%，G 占 24.9%，其中 G+C（60.7%）的含量明显高于 A+T（39.4%）的含量（表 1）。

运用 Dnasp 计算可得到 3 种不同单倍型，各单倍型序列见图 2a。遗传分化指数  $F_{st}$  为 1.000，表明苞叶姜居群间高度分化。苞叶姜 ITS2 序列  $F_u$ 's  $F_s$  和 Tajima's D 分别是 1.589 和 0.32863，没有呈现负值表示苞叶姜居群稳定。ITS2 序列的错配分布（Mismatch distribution）分析（图 3a），观测值曲线未呈单峰，显示苞叶姜近期没有经历过居群范围扩张。

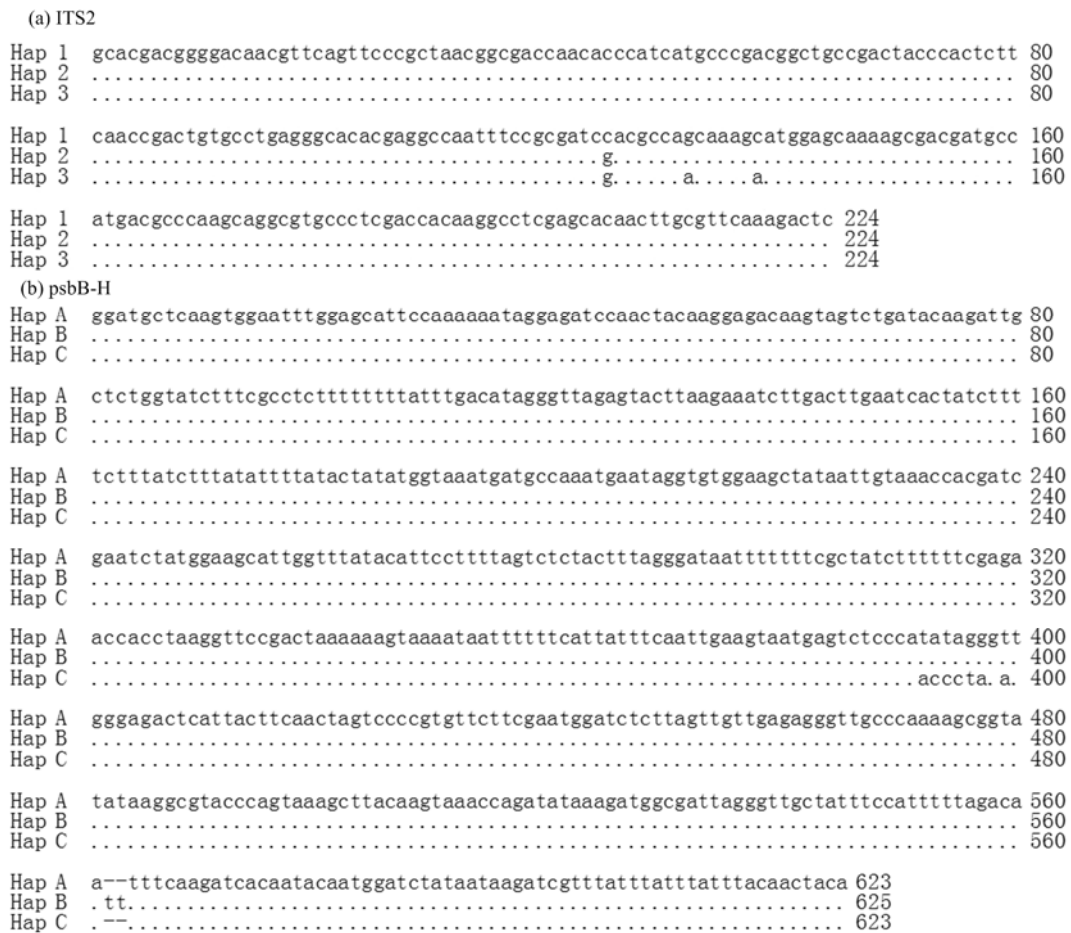


图 2 ITS2 序列(a)和 psbB-H(b)序列对位排列情况  
 Figure 2 Sequences alignment of ITS2 and psbB-H

表 1 苞叶姜 nrDNA ITS2 区域和 cpDNA psbB-H 区域序列的比较

Table 1 Comparison between nrDNA ITS2 and cpDNA psbB-H sequences of *Pyrgophyllum yunnanense*

序列名称 Sequence	长度/bp Length	转换/颠换 Transitions/Transversions	变异百分率/% Percentage of variable sites	(G+C)含量/% (G+C) content	核苷酸多态性 Nucleotide diversity
ITS2	224	0.26	1.339	60.7	0.00295
psbB-H	623~625	0.33	1.284	33.9	0.00551

### 2.3 苞叶姜各居群 cpDNA psbB-H 区域序列分析

对苞叶姜 135 个体的 psbB-H 区域进行测序, 经过处理得到序列长度变异范围为 623~625 bp 的序列, 有 2 个碱基的插入或缺失 (图 2b), 由于此区域不编码蛋白, 发生插入或缺失后不容易被淘汰。此序列中, 共有保守位点 617 个, 变异位点 8 个, 其中 2 处为转换 (394 bp 处 C-T 转换, 397 bp 处 A-G 转换), 6 处为颠换 (392 和 399 bp 处 A-T 颠换, 393 bp 处为 A-C 颠换, 395 bp 处为 A-C 颠换, 396 和 398 bp 处为 G-T 颠换)。转换/颠换比值为 0.33, 变异主要来源于颠换。psbB-H 区域序列的变异位点百分率为 1.284%, 核苷酸多态性为 0.00295。所得序列碱基组成平均值为 T 占 35.0%, C 占 16.2%, A 占 31.2%, G 占 17.7%, A+T (66.1%) 含量明显高于 G+C (33.9%) 的含量 (表 1)。

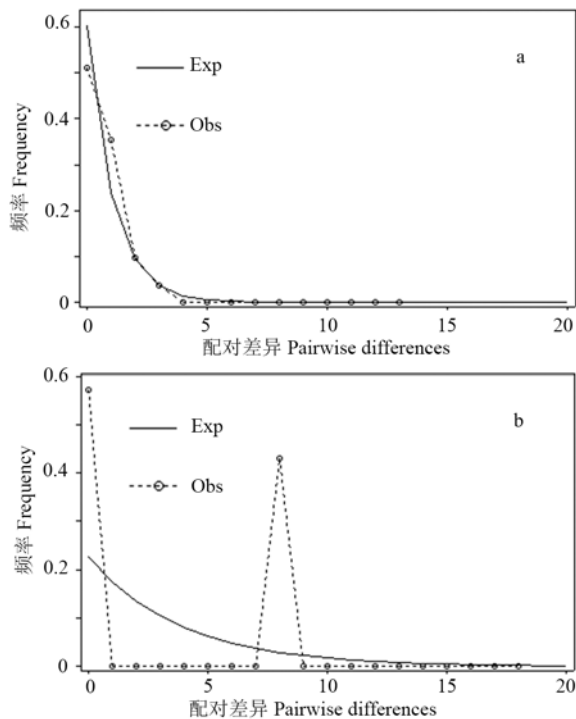


图 3 苞叶姜所有个体 nrDNA ITS2 区域序列数据 (a) 以及 cpDNA psbB-H 区域序列数据的错配分布 (b)

Figure 3 Mismatch distribution of sequences data of nrDNA ITS2 (a) and cpDNA psbB-H (b) from all individuals of *Pyrgophyllum yunnanense*

运用 Dnasp 计算得到 3 种不同单倍型, 与 nrDNA ITS2 分出的单倍型数目一样, 各单倍型序列

见图 2。遗传分化指数  $F_{st}$  为 1.000, 苞叶姜居群间高度分化, 与 ITS2 分析结果一致。苞叶姜 psbB-H 区域序列  $F_u$ 's  $F_s$  和 Tajima's  $D$  分别是 12.816 和 2.84251, 表明苞叶姜居群稳定, 与 ITS2 序列分析结果一致。psbB-H 区域序列的错配分布 (Mismatch distribution) 分析显示 (图 3b), 观测值曲线呈单峰分布, 表明苞叶姜近期可能经历过居群范围扩张, 这与 nrDNA ITS2 序列的错配分布分析 (图 3a) 有差异。

### 3 讨论和结论

在大多数被子植物中, cpDNA 常被用来研究群体遗传学和谱系地理学中的遗传瓶颈效应、奠基者效应和遗传漂变<sup>[16]</sup>。而 nrDNA ITS 序列, 是目前研究最广泛的核基因序列, 在研究较低分类单元的关系时呈现出较高的信息位点百分率<sup>[17]</sup>, 同时在揭示异域或间断分布居群间的关系提供了一定的价值<sup>[6]</sup>。因此, 将 cpDNA (母系遗传) 与 nuDNA (双亲遗传) 分子标记结合分析, 可以起到相互补充的作用, 从繁育系统等方面对谱系地理学进行综合研究。本研究分析了苞叶姜居群 nrDNA ITS2 与 cpDNA psbB-H 序列, 结果表明苞叶姜 2 套植物基因组的变异速率相近, 这可能与苞叶姜是闭花自花授粉的自交繁育系统有关<sup>[18]</sup>。同时, 基于 nrDNA ITS2 与 cpDNA psbB-H 序列计算的遗传分化指数 ( $F_{st}=1.000$ ), 苞叶姜居群间呈高度分化状态, 这与其所处的横断山区复杂的地貌和环境异质性有关。nrDNA ITS2 与 cpDNA psbB-H 序列所得出的单倍型数目相同, 但单倍型地理分区有差异, 这在研究时可以两者结合说明谱系地理关系。2 序列所得到的 2 种中性检验值均为正值, 表明苞叶姜居群可能呈长期稳定状态。但在 nrDNA ITS2 与 cpDNA psbB-H 片段的错配分布 (Mismatch distribution) 分析结果出现了分歧, 后者表明苞叶姜居群可能经历过居群近期范围扩张。要了解苞叶姜更详细的谱系地理关系, 还需做进一步分析。从变异速率、单倍型数目、遗传分化指数、中性检验值分析结果对比看, nrDNA ITS2 与 cpDNA psbB-H 序列所反映的居群间的进化关系一致, 因此苞叶姜的谱系地理学研

究可以结合 nrDNA ITS2 与 cpDNA psbB-H 序列分析。

### 参考文献:

- [1] 吴德邻, 陈忠毅. 中国姜科-新属-苞叶姜属[J]. 植物分类学报, 1989, 27(2): 124-128.
- [2] 吴德邻. 姜科植物地理[J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(2): 1-14.
- [3] 廖景平, 吴七根. 国产大苞姜属和苞叶姜属种子解剖学特征及其系统学意义[J]. 广西植物, 1996, 16(3): 209-215.
- [4] 钟满香, 王瑞珍, 路国辉, 等. 苞叶姜大小孢子发生和雌雄配子体发育[J]. 植物学报, 2009, 44(6): 694-700.
- [5] AVISE J C. Phylogeography: retrospect and prospect[J]. J Biogeogr, 2009, 36(1): 3-15.
- [6] BALDWIN B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae[J]. Mol Phylogenet Evol, 1992, 1(1): 3-16.
- [7] CLEGG M T, GAUT B S, LEARN G H, et al. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution[J]. P Natl Acad Sci, 1994, 91(15): 6795-6801.
- [8] 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.
- [9] DOYLE J J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15.
- [10] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [11] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[C]//Nucleic acids symposium series. London: Oxford University Press, Information Retrieval Ltd., 1999, 41(41): 95-98.
- [12] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [13] ROZAS J, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, MESSEGUER X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods[J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [14] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. Genetics, 1989, 123 (3): 585-595.
- [15] FU Y X, LI W H. Statistical tests of neutrality of mutations[J]. Genetics, 1993, 133 (3): 693-709.
- [16] PETIT R J, PINEAU E, DEMESURE B, et al. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks[J]. P Natl Acad Sci, 1997, 94(18): 9996-10001.
- [17] BROWN D D, WENSINK P C, JORDAN E. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes[J]. J MOL BIOL, 1972, 63(1): 65-73.
- [18] 王英强. 姜科植物传粉生物学的研究[D]. 广州:中国科学院华南植物园, 2004.