

基于 ITS 序列探讨西瓜种下分化

周先治¹, 陈晟¹, 吴宇芬¹, 陈阳¹, 赵依杰²

(¹福建省农科院农业生物资源研究所, 福州 350003; ²福州市农业科学研究所, 福州 350018)

摘要:【研究目的】对源自中国和非洲的 15 个西瓜 *Citrullus lanatus* 的核糖体基因内转录间隔区 (internal transcribed spacers, ITS) 全序列进行比较分析。供试材料包括 *Mucosospermus* 亚种、*Vulgaris* 亚种、源自中国的 3 个品种、源自加纳的 3 个品种和 1 个来自布基纳法索的品种。【结果】西瓜种内总变异位点 27 个, 占总碱基数的 5.93%, 6 个信息位点, 占总碱基数的 1.32%。不同品种西瓜的 ITS 序列全长 455~473bp, G + C 含量 61.49%~63.41%。【结论】从 ITS 序列全长构建的系统树可以看出西瓜具有地理分化现象, 中国西瓜和非洲西瓜分属不同分支。此研究对西瓜的引种、育种以及研究西瓜的地理演化都具有一定的指导意义。

关键词: 西瓜; 核糖体; 内转录间隔区; 种下分化

中图分类号: S321

文献标识码: A

论文编号: 2009-1575

Intraspecies Relationships in *Citrullus lanatus* Inferred from ITS Sequence Data

Zhou Xianzhi¹, Chen Sheng¹, Wu Yufen¹, Chen Yang¹, Zhao Yijie²

(¹Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003;

²Fuzhou Institute of Agricultural Sciences, Fuzhou 350018)

Abstract:【OBJECTIVE】A phylogeny of the subspecies in *Citrullus lanatus*, which comprises subsp. *Mucosospermus*, subsp. *Vulgaris*, 3 cultivators from China, 3 cultivators from Ghana and one from Burkina Faso, was reconstructed based on the nucleotide sequences of ITS regions of rDNA. To elucidate relationships among intraspecies in *Citrullus lanatus*. And to assess the biogeography of the species. 【RESULTS】Phylogenetic analyses indicated that there were 27 variable sites which were 5.93% of entire sequence and 6 informative sites which were 1.32% of total sequence in *Citrullus lanatus*. The length range of ITS sequence in *Citrullus lanatus* was from 455 to 473 bp, the percentage of G + C content varied from 61.49% to 63.41%. 【CONCLUSION】Topology obtained for the ITS data revealed that geographical differentiation in *Citrullus lanatus* from China and Africa. Analysis of the internal transcribed spacer sequences is a good tool to discriminate subspecies in *Citrullus lanatus* and was useful in *Citrullus lanatus* new species introduction, breeding, and molecular evolution research.

Key words: *Citrullus lanatus*, ribosome DNA (rDNA), internal transcribed spacer (its), intraspecies differentiation

0 引言

西瓜 *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. 在植物分类学中属于葫芦科 (Cucurbitaceae) 的西瓜属 (*Citrullus*), 该种的近缘野生种、亚种、变种很多, 具有极为

丰富多彩的遗传“多样性”。西瓜原产于非洲, 在五代时期引入中国进行种植。西瓜是中国重要的经济水果之一。但是由于近几十年来在西瓜育种的过程中很多品种相互杂交, 结果造成西瓜品种的遗传基

基金项目: 省科技厅重点项目“台湾十字花科、葫芦科蔬菜良种引进筛选及栽培技术研究”(200710037); 省自然科学基金“镧对西瓜光合系统能量传递和强光防御机制调节作用的研究”(2009J01069)。

第一作者简介: 周先治, 男, 1976 年出生, 助理研究员, 博士, 从事生物资源研究, 通信地址: 350003 福建省福州市五四北路 247 号, E-mail: xianzhizhou@126.com。

通讯作者: 吴宇芬, 女, 1965 年出生, 副研究员, 研究方向: 西瓜、甜瓜及砧木新品种选育与栽培技术研究。

收稿日期: 2009-08-10, 修回日期: 2009-08-31。

础变化趋向是越来越狭窄。故而亟待加快西瓜的遗传亲缘关系的鉴定以及现代西瓜育种的步伐。

目前,西瓜的遗传亲缘关系的鉴定一般是利用表型鉴定。然而表现型不仅易受到外界环境条件的影响,而且往往是由多个基因共同作用的结果。因而表现型在一般情况下未必真实地反映基因型。故而从种质的基因型着手进行分析是现在鉴定常用的分析技术。已有学者采用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA)^[1]、SSR (Simple Sequence Repeat, 简单序列重复)^[2]、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性)^[2-3]、SRAP (Sequence-Related Amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性)^[4]等技术进行了西瓜亲缘关系和遗传鉴定,由于西瓜遗传基础极其狭窄,品种间多态性较少,致使这些标记检测效率很低。

植物核糖体内转录间隔区 ITS (Internal transcribed spacer) (18S-5.8S-26S) 所受的选择压力小,进化速率较快,在物种间表现出较高的差异。因此,真核生物细胞基因组中内转录间隔区序列可以作为一种遗传标记。ITS 是最常用作属、种、种下水平遗传分析的片段,截至 2004 年 10 月在 GenBank 中被子植物的 ITS 序列超过 36000 条^[5]。该片段成功应用于杜鹃属^[6]、睡莲属^[7]、益母草类^[8]、杨属^[9]、桑属^[10]等植物物种亲缘关系及系统发育研究,该研究测序并登陆了 3 株来自国内不同地区的西瓜品种的 ITS 序列,与 GenBank 上已有的部分西瓜 ITS 进行了比对分析,旨在通过比对分析不同来源、不同品种的西瓜的 ITS 序列,研究西瓜的种下分化和遗传多样性,为西瓜的引种、育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

材料来源见表 1。

1.2 叶片基因组 DNA 提取

于 1.5 ml 离心管中,将 0.1 g 叶片用液氮磨成细粉末,加入 600 L 预热的 CTAB 提取缓冲液 (50 mM Tris·HCl, pH8.0; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 1.4 mM NaCl, 临用前加入 2% β-巯基乙醇),混匀后置于 65℃ 水浴中温育 45 min,期间混匀数次;4℃ 下 12 000 rpm 离心 20 min,将上清液转移到新的 1.5 ml 离心管;上清液加入等体积预冷的氯仿:异戊醇(24:1),将离心管缓慢颠倒几分钟使管内充分混匀;4℃ 下 12 000 rpm 离心 10 min。将上清小心转移到新的 1.5 ml 离心管中;加 2/3 体积预冷的异丙醇,缓慢混匀,置于 -20℃ 下

表 1 材料来源

编号	类群	原产地	登录号
1	西瓜 mucosospermus 亚种	贝宁	AM981109*
2	西瓜 mucosospermus 亚种	贝宁	AM981108*
3	西瓜 mucosospermus 亚种	贝宁	AM981107*
4	西瓜 mucosospermus 亚种	贝宁	AM981106*
5	西瓜	加纳	AM981105*
6	西瓜	加纳	AM981104*
7	西瓜	加纳	AM981103*
8	西瓜 vulgaris 亚种	几内亚	AM981101*
9	西瓜 vulgaris 亚种	加纳	AM981100*
10	西瓜 vulgaris 亚种	贝宁	AM981099*
11	西瓜 vulgaris 亚种	马里	AM981098*
12	西瓜	布基纳法索	EF595859*
13	西瓜	中国台湾	FJ915098
14	西瓜	中国甘肃	FJ915099
15	西瓜	中国甘肃	FJ915100

注:*序列下载自 GenBank。

培养 30 min; 4℃ 下 13 000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 用 1 ml 预冷的 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次; 加 100 μl 灭菌过的 ddH₂O, 溶解 DNA。

1.3 ITS 序列的扩增与测定

ITS 全序列 (含 5.8S rRNA 基因) 采用引物 ITS5a: 5' -CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3'^[11] 和引物 ITS4: 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'^[12] 扩增获得。PCR 反应体系体积为 50 μl: 其中模板 100 ng, 2 mM dNTP 5 μl, 10×buffer 5 μl; Taq 酶 2 U; 引物 ITS5a 和 ITS4 各 20 pmol。PCR 扩增程序为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 1 min; 50℃ 退火 1 min; 72℃ 延伸 2 min; 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒 (杭州博日生物技术有限公司) 纯化后, 由上海生工生物工程服务有限公司测序。

1.4 序列分析

将 ITS 序列测序结果进行分析, 确定 ITS1、ITS2 和 5.8S rRNA 区, 并登陆 GenBank, 所得序列采用 DNASTa 软件进行排序和 G+C 含量分析, 利用 MEGA 4.0 软件进行系统发育分析, 并以自展法 (bootstrap) 进行检测, 共循环 1000 次, 采用最大简约法 (Maximum parsimony) 构建严格一致树。

2 结果与分析

2.1 西瓜 ITS 序列的变异分析

供试材料的 5.8S rRNA 的长度均为 162 bp, G +

表2 西瓜 ITS 长度和 G + C 含量

编号	种类	ITS1		ITS2	
		长度/bp	G + C 含量/%	长度/bp	G + C 含量/%
1	西瓜 mucosospermus 亚种	221	59.28	247	65.18
2	西瓜 mucosospermus 亚种	221	59.28	247	65.18
3	西瓜 mucosospermus 亚种	221	59.28	247	65.18
4	西瓜 mucosospermus 亚种	221	59.28	247	65.18
5	西瓜	221	59.28	247	65.18
6	西瓜	221	59.28	247	65.18
7	西瓜	221	59.28	247	65.18
8	西瓜 vulgaris 亚种	221	59.28	251	66.14
9	西瓜 vulgaris 亚种	221	59.28	252	66.27
10	西瓜 vulgaris 亚种	221	59.28	252	66.27
11	西瓜 vulgaris 亚种	221	59.28	252	66.27
12	西瓜	219	59.36	243	65.02
13	西瓜	218	60.55	237	63.29
14	西瓜	218	60.55	237	63.29
15	西瓜	218	60.55	237	63.29

C 含量均为 58.64%, 表明西瓜核糖体基因的高度保守性。15 个西瓜的 ITS1 的长度为 218 ~221 bp, 15 个西瓜的 ITS1 的 G + C 含量变化范围为 59.28%~60.55%, 西瓜 mucosospermus 亚种、西瓜 vulgaris 亚种和源自加纳的 3 个西瓜品种的 ITS1 序列完全一致, 源自布基纳法索和中国的 4 个西瓜品种的 ITS1 序列与上述 11 个西瓜品种相比差异主要有碱基替换

和碱基缺失两种类型突变。15 个西瓜的 ITS2 的长度为 237~252 bp, G + C 含量变化范围为 63.29%~66.27%, 西瓜 mucosospermus 亚种和源自加纳的 3 个西瓜品种的 ITS2 的序列无差异, 源自几内亚的西瓜 vulgaris 亚种与其它 3 个同亚种的西瓜相比, ITS2 序列有碱基缺失; 源自布基纳法索和中国的西瓜品种的 ITS2 序列均短于上述西瓜品种, 序列分析发现在

表3 西瓜种内 ITS 序列及其变异

序列	序列长度/bp	变异位点数目	信息位点数目	G + C 含量/%
ITS1	218 - 221	6	1	59.68 - 60.55
ITS2	237 - 252	21	5	63.29 - 66.27
ITS1 + ITS2	455 - 473	27(5.93%)	6(1.32%)	61.49 - 63.41

ITS2 片段内主要有碱基替换和碱基缺失两种类型的突变(表2)。ITS 序列中的总变异位点数为 27, 占总碱基数的 5.93%, 信息位点数 6 个, 占 1.32%(表3)。

2.2 西瓜 ITS 序列遗传距离及系统树构建

用 DNASTar 软件分析遗传距离(表4)可看出西瓜 mucosospermus 亚种与来自加纳的西瓜品种的 ITS 序列完全一致, 遗传距离为零; 西瓜 mucosospermus 亚种与 vulgaris 亚种的遗传距离为 0.002; 西瓜 mucosospermus 亚种与源自布基纳法索的西瓜的遗传距离为 0.005, 西瓜 vulgaris 亚种与源自布基纳法索的西瓜的遗传距离为 0.003, 西瓜 mucosospermus 亚种与源自中国的 3 个西瓜品种的遗传距离达到 0.008, 西瓜 vulgaris 亚种与源自中国的 3 个西瓜品种

的遗传距离达到 0.010, 源自布基纳法索的西瓜与中国的 3 个西瓜品种的遗传距离最大达到 0.013。

根据测序结果, 采用最大简约法对 15 个不同来源的西瓜品种 ITS 序列构建严格一致树, 其步长为 8, 一致性指数(CI)和维持性指数(RI)为分别为 1.000 和 1.000, 拓扑结构唯一确定, 系统分支上的数字为 Bootstrap 重复 1000 次抽样检验得出的分支支持率(图1)。

系统发育树上的拓扑结构显示, 源自非洲的 12 个西瓜品种在同一支上, 支持率为 99%, 而 vulgaris 亚种、源自布基纳法索的西瓜品种是非洲西瓜的一个分支, 支持率为 65%。源自中国的 3 个西瓜品种与非洲品种不同, 属于西瓜另一分支, 支持率为 99%(图1)。

表4 西瓜 ITS 序列遗传距离(×100)

材料	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.0	-													
3	0.0	0.0	-												
4	0.0	0.0	0.0	-											
5	0.0	0.0	0.0	0.0	-										
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-									
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-								
8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-							
9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	-						
10	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	-					
11	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	-				
12	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	-			
13	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3	-		
14	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3	0.0	-	
15	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3	0.0	0.0	-

3 讨论

对于探讨西瓜种内的遗传多样性和亲缘关系,已有学者利用 RAPD^[1]、ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats, 简单序列重复区间扩增多态性)^[13]、SSR^[13]、AFLP^[2-3]、SRAP^[4]等分子标记做了许多工作。植物核糖体 DNA 的 18S~26S 内转录间隔区 (ITS) 是从碱基的差异来探讨物种遗传差异和系统进化规律的。被子植物的 ITS 序列在不同植物类群中可用来解决科内不同等级的系统发育和分类问题^[14-18]。不同类群的植物生长的地理、气候环境因子不同,不同类群植

物起源和进化速率也不同,不同分类等级,ITS 序列所提供的信息也是不同的。在对菊科沙蒿属艾亚属 *Artemisia* section *Tridentatae* (Asteraceae) 23 个种植物的研究中,ITS1 序列信息位点数占 7.82%,ITS2 序列的信息位点数占 9.84%^[19]。在对蔷薇科绣线梅族 Tribe Neillieae (Rosaceae) 植物的分子系统发育和生物地理学研究中,ITS 序列的信息位点数占 12.0%^[20]。Moore 等^[21]基于 ITS 序列研究了菊科向日葵族的 *Balsamorhiza* 属和 *Wyethia* 属植物的系统发育,信息位点数占 25.74%。在对新疆石竹属 8 个种的研究

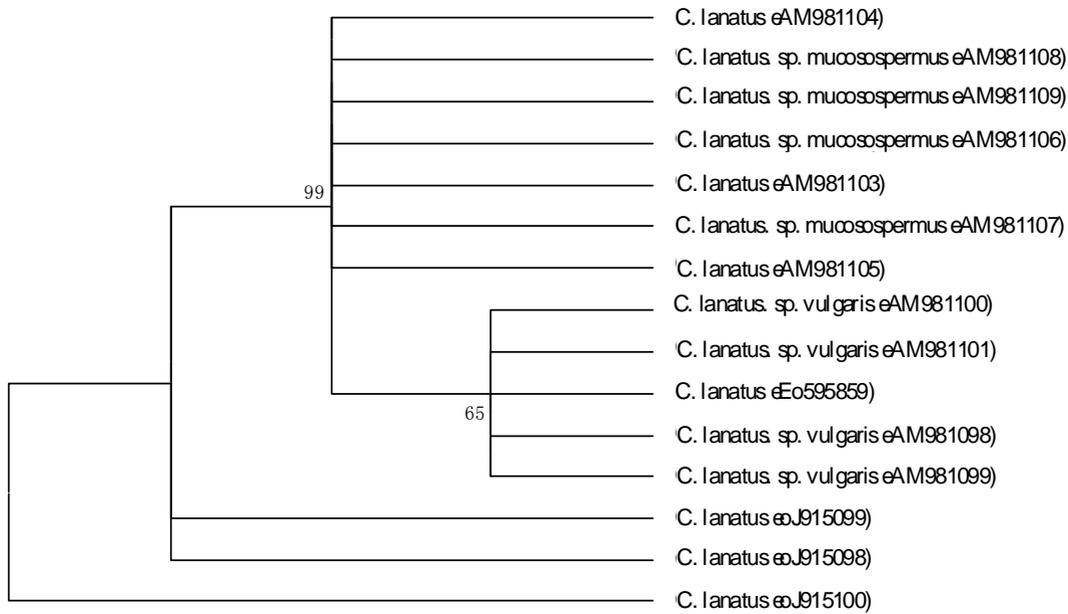


图1 基于 ITS 序列利用最大简约法对西瓜材料构建的严格一致树
注:分支上的数字表示该分支的自展支持率 bootstrap 的值,显示 > 50%, 1000 次重复。

中,ITS序列信息位点的比例为2.98%^[22]。已有研究利用ITS序列探讨植物种下分化,曾明等研究发现中药葛根种内的ITS序列差异很小^[23],余永邦等发现可以利用ITS序列来区分不同产地的太子参^[24]。该研究通过对不同来源的15个西瓜品种的ITS序列比较分析,信息位点占的比例为1.32%,具有较强的系统发育信号,系统树可以区分开西瓜 *mucosospermus* 亚种和 *vulgari* 亚种,还可以将亚洲和非洲不同地理来源的西瓜品种区分开。可见ITS序列能应用于西瓜亚种间的研究,这对于研究西瓜的地理演化具有一定的意义。

从ITS序列比对结果来看,此研究测序的3个来自中国台湾和西藏的不同品种的西瓜的ITS序列完全一致,来自非洲的12个西瓜品种,不同亚种间的遗传距离也在0.002~0.005之间,同地理来源的西瓜品种的遗传基础极窄。这与前人的研究^[1-4]是一致的。非洲和亚洲的西瓜品种的遗传距离在0.010~0.013,遗传距离比同地理来源大,作者测序比对了不同来源的葫芦品种的ITS序列,同样发现不同地理来源的品种遗传距离要显著大于同一地理来源的品种(待发表),因此西瓜的杂交育种有必要拓展亲本来源,特别引入不同地理来源的西瓜亲本,这样可以拓宽西瓜种质的遗传基础。

参考文献

- [1] Zhang X P, Rhode B B, Skorupsk H. RAPD molecular markers in watermelon [J]. *Cucubit Genet Coop Rep*, 1994, 17: 116 - 119.
- [2] Levi A. Construction of a reference genetic linkage map for watermelon [A]. *Cucubitaceae*, 2002: 28-37.
- [3] 刘文革, 王鸣, 阎志红. 西瓜二倍体及同源多倍体遗传差异的 AFLP 分析 [J]. *果树学报*, 2004, 21(1): 46-49.
- [4] 李晓慧, 田朝阳, 王从彦. SRAP 分子标记分析西瓜遗传多态性 [J]. *生物技术*, 2007, 17(3): 23-26.
- [5] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, 102: 8369-8374.
- [6] 高连明, 李德铢, 张长芹, 等. 基于ITS序列探讨杜鹃属的亚属和组间系统关系 [J]. *植物学报*, 2002, 44(11): 1351-1356.
- [7] 刘艳玲, 徐立铭, 倪学明, 等. 睡莲科的系统发育: 核糖体DNA ITS 区序列证据 [J]. *植物分类学报*, 2005, 43(1): 22-30.
- [8] 杨志业, 晁志, 霍克克, 等. 益母草类中药原植物的核糖体内转录间隔区序列分析 [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(11): 1593-1595.
- [9] 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.
- [10] 赵卫国, 潘一乐, 张志芳. 桑属植物ITS序列研究与系统发育分析 [J]. *蚕业科学*, 2004, 30(1): 11-14.
- [11] Stanford A. M, Harden R, Parks, C R. Phylogeny and Biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on *matK* and ITS sequence [J]. *Am. J. Bot.*, 2000, 87: 872 - 882.
- [12] White T J, Burns T, Lee S & Taylor J. in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis M, Gelfand D, Sninsky J. & White T. (Academic, San Diego), 1990. 315 - 322.
- [13] 李菊芬, 许玲, 马国斌. 利用分子标记技术鉴定西瓜杂交种纯度 [J]. *上海农业学报*, 2009, 25(1): 72-75.
- [14] Hsiao C, Chatterton N J, Asay K H, et al. Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, Triticeae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences [J]. *Genome*, 1995, 38(2): 211-223.
- [15] Wissemann V, Ritz C M. The genus *Rosa* (Rosaceae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atpB-rbcL* intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy [J]. *Bot. j. Linn. Soc.*, 2005, 147: 275 - 290.
- [16] Gurushidze M, Mashayekhi S, Blattner F R, et al. Phylogenetic relationships of wild and cultivated species of *Allium* section *Cepa* inferred by nuclear rDNA ITS sequence analysis [J]. *Plant Syst. Evol.*, 2007, 269 (3-4): 259-269.
- [17] Blattner F R. Phylogenetic analysis of *Hordeum* (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences [J]. *Molec Phylogenet Evol*, 2004, 33: 289-299.
- [18] 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: 3-16.
- [19] Kornkven A B, Watson L E, Estes J R. Phylogenetic analysis of *Artemisia* section *Tridentatae* (Asteraceae) based on sequences from the internal transcribed spacers (its) of nuclear ribosomal DNA [J]. *Am. J. Bot.*, 1998, 85(12): 1787 - 1795.
- [20] Oh S and Potter D. molecular phylogenetic systematics and biogeography of tribe Neillieae (Rosaceae) using DNA sequences of cpDNA, rDNA, and *leafy* [J]. *Am. J. Bot.*, 2005, 92 (1): 179 - 192.
- [21] Moore A J, Bohs L. An ITS phylogeny of *Balsamorhiza* and *Wyethia* (Asteraceae: Heliantheae) [J]. *Am. J. Bot.*, 2003, 90 (11): 1653 - 1660.
- [22] 张露, 蔡友铭, 诸葛强, 等. 新疆石竹属野生种核糖体DNA的ITS序列与亲缘关系 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(6): 549 - 554.
- [23] 曾明, 马雅军, 郑水庆, 等. 中药葛根及其近缘种的rDNA-ITS序列分析 [J]. *中国药理学杂志*, 2003, 38(3): 173-175.
- [24] 余永邦, 秦民坚, 梁之桃, 等. 不同产区太子参的rDNA ITS区序列的比较 [J]. *植物资源与环境学报*, 2003, 12(4): 1-5.

致谢:感谢林营志博士在序列比对分析方面给予的指导帮助,感谢肖荣凤助理研究员在植物基因组总DNA提取方面给予的指导帮助。