

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.003

焦淑静, 黄现恩, 谷青, 等. 席藻 ITS 序列拷贝类型及进化关系分析[J]. 广西植物, 2014, 34(3):294-298

Jiao SJ, Huang XE, Gu Q, et al. Analyses on the types of copy and evolutionary relationships of ITS sequence of *Phormidium*[J]. *Guihaia*, 2014, 34(3): 294-298

## 席藻 ITS 序列拷贝类型及进化关系分析

焦淑静, 黄现恩, 谷青, 史全良\*

(苏州大学 医学部基础医学与生物科学学院, 苏州 215123)

**摘要:** 由于协同进化未完成, 蓝藻的 16S-23S rDNA 基因间隔序列(ITS)存在多种拷贝类型, 目前蓝藻 ITS 序列的拷贝类型分布以及演化规律尚未研究清楚。该文采用本地采集的席藻属样品, 测定其 ITS 序列, 并结合基因库中已有的席藻 ITS 序列, 对席藻属蓝藻 ITS 序列拷贝类型及其之间的进化关系进行探讨。结果显示, 席藻属 ITS 序列的 PCR 产物有两种情况, 即单一条带(仅出现 ITS-IA 或 ITS-I 型)和两条条带(同时出现 ITS-IA 和 ITS-N 型), 其中以单一条带的 ITS-IA 型最为普遍; 在基于 ITS 序列的系统发生树中, ITS-IA 型和 ITS-I 型均各自聚为一个组群, 且 ITS-IA 型的组群节点出现较早, 表明席藻属 ITS-I 型极有可能是由其原来的 ITS-IA 型缺失 tRNA<sup>Ala</sup> 编码区进化而来, ITS-IA 型应为席藻 ITS 序列的基本结构。

**关键词:** 席藻; 16S-23S rDNA 基因间隔序列; 拷贝类型; 系统发育; 进化关系

**中图分类号:** Q941.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3142(2014)03-0294-05

## Analyses on the types of copy and evolutionary relationships of ITS sequence of *Phormidium*

JIAO Shu-Jing, HUANG Xian-En, GU Qing, SHI Quan-Liang\*

(School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** The coevolution of the ITS sequences hasn't been fully accomplished leading to multiple types of copy in cyanobacteria, while the distribution rule of ITS copy in cyanobacteria are unclear. We used *Phormidium* strains picked up from Suzhou districts and 12 other strains selected from Genebank as the materials to study the characteristics and the evolutionary relationships among different types of copy. The results showed that the PCR product of ITS of *Phormidium* had single band (i. e. ITS-IA type or ITS-I type) or two bands (i. e. ITS-IA and ITS-N type), and ITS-IA was the most popular type in the materials used in this study; the phylogeny analyzed results indicated that ITS-IA type and ITS-I type were distributed in different groups respectively, and the ITS-IA group appeared earlier than ITS-I group. Thus we proved that ITS-I type was evolved from a deletion of tRNA<sup>Ala</sup> coding region of ITS-IA type, and ITS-IA type should be the basic structure of ITS copy of *Phormidium*.

**Key words:** *Phormidium*; ITS; the type of copy; phylogeny; evolutionary relationship

蓝藻的 ITS 序列具有较丰富的变异位点和信息位点, 进化速率快, 受外界环境选择压力小, 在序列长度和组成上都有很高的变异性 (Garcia *et al.*, 1996)。近年来用 ITS 序列作为分子标记做近缘蓝

藻的系统进化分析的报道相对增多 (Baker *et al.*, 2003; Ferris *et al.*, 2003; Karina *et al.*, 2009)。但由于协同进化尚未完成, 蓝藻的 ITS 序列存在多种拷贝类型现象, 主要有三种类型 (Iteman *et al.*,

收稿日期: 2013-11-27      修回日期: 2013-12-06

基金项目: 国家自然科学基金(3117146)

作者简介: 焦淑静(1987-), 女, 河南永城市人, 硕士研究生, 主要研究方向为植物资源及进化遗传学, (E-mail) jiaoshujing1988@163.com。

\*通讯作者: 史全良, 博士, 副教授, 主要研究方向是植物资源及进化遗传学, (E-mail) shiquanliang@suda.edu.cn。

2000): 16S rRNA-tRNA<sup>Ile</sup>-tRNA<sup>Ala</sup>-23S rRNA(携带 tRNA<sup>Ile</sup>和 tRNA<sup>Ala</sup>编码区,简称 ITS-IA 类型), 16S rRNA-tRNA<sup>Ile</sup>-23S rRNA(只携带 tRNA<sup>Ile</sup>编码区,简称 ITS-I 类型), 16S rRNA-23S rRNA(无 tRNA 编码区,简称 ITS-N 类型)。其中 ITS-IA 和 ITS-N 类型在蓝藻门的大部分种属中普遍存在,且 ITS-IA 类型被认为是最基本的结构(Sarah *et al.*, 2001),而 ITS-I 类型出现的频率则较小,早期的研究发现 ITS-I 类型仅在 *Microcystis* (Otsuka *et al.*, 1999)、*Spirulina* (Nelissen *et al.*, 1994) *Oscillatoria* sp.(陈月琴等, 1999)等属存在,而近年来 Taton *et al.*(2006)和 Otakar *et al.*(2011)在南极洲以及 Marquardt *et al.*(2007)在西班牙采集的席藻属样品中也发现该拷贝类型的存在。

目前关于蓝藻中 ITS 序列各拷贝类型的特点

及进化关系的研究还较少。本文选取在苏州市区采集的席藻样品测定其 ITS 序列,并结合基因库上已有的席藻的 ITS 序列,探讨席藻属内不同 ITS 拷贝类型之间的进化关系,以期对席藻属的 ITS 拷贝类型以及不同拷贝类型之间的进化关系有一个更深入更全面的了解,为进一步验证其在系统分类学中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料如表 1 所示,其中本实验室的席藻样品 *Phormidium* sp. 6A10、*Phormidium* sp. 7B10、*Phormidium* sp. 7D6、*Phormidium* sp. 8B8,分别采集于苏州虎丘区潮湿土壤表面、工业园区河道底

表 1 用于 ITS 序列分析的蓝藻种类列表

Table 1 List of cyanobacteria used for the analyses of ITS

种名 Species	编号 Code	接收号 Accession No.	拷贝类型 Type of copy	来源 Source
<i>Phormidium</i> sp. 6A10	J1	KF681511	I	本地采集
<i>Phormidium</i> sp. 7B10	J2	KF751350	IA	本地采集
<i>Phormidium</i> sp. 7D6	J3	KF681512	I	本地采集
<i>Phormidium</i> sp. 8B8	J4	KF751351	IA	本地采集
<i>Phormidium</i> sp. CCMEE327	J5	AM398945	IA	Genbank
<i>Phormidium</i> sp. OL S12	J6	AM398967	IA	Genbank
<i>Phormidium</i> sp. OL S6	J7	AM398978	IA	Genbank
<i>Phormidium</i> sp. OL 75	J8	AM398961	IA	Genbank
<i>Phormidium</i> sp. OL sphere	J9	AM398974	IA	Genbank
<i>Phormidium</i> priestleyi ANT. LG2. 4	J10	AY493641	IA	Genbank
<i>Phormidium</i> priestleyi LH66. 1	J11	JF269172	IA	Genbank
<i>Phormidium irriguum</i> f. <i>minor</i> ETS-02	J12	FN813339	IA	Genbank
<i>Phormidium</i> cf. <i>irriguum</i> CCALA 759	J13	FN813340	IA	Genbank
<i>Phormidium murrayii</i> ANT. LPE. 1	J14	AY493630	I	Genbank
<i>Phormidium murrayii</i> ANT. LPE. 2	J15	AY493631	I	Genbank
<i>Phormidium</i> sp. CCAP 1462-11	J16	AM398946	I	Genbank
<i>Microcoleus vaginatus</i> clone 205-4C *	J17	AF363936	IA	Genbank
<i>Microcoleus vaginatus</i> clone 205-5D *	J18	AF363937	IA	Genbank

注: IA=16S rRNA-tRNA<sup>Ile</sup>-tRNA<sup>Ala</sup>-23S rRNA, I=16S rRNA-tRNA<sup>Ile</sup>-23S rRNA, 标 \* 的序列为外组群序列。

Note: IA=16S rRNA-tRNA<sup>Ile</sup>-tRNA<sup>Ala</sup>-23S rRNA, I=16S rRNA-tRNA<sup>Ile</sup>-23S rRNA, the sequences with snowflake symbol are outgroups.

部、工业园区向阳草坪土壤表面、相城区农业生态园稻田旁芦苇池塘。另外的 14 株蓝藻样品信息来自 Genbank(基因库)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 席藻样品 ITS 序列的测定 采用 EZ-10 Spin Column Genomic DNA Isolation Kit 试剂盒进行样品总 DNA 提取。以由生工生物工程(上海)股份有限公司合成的 322; 5'-TGAACACACCGCCCGTC-3', 340; 5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3' 为引

物(Iteman *et al.*, 2000)进行 ITS 序列的 PCR 扩增,反应在 TakaraTP600 型 PCR 仪上进行。PCR 反应程序是 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 57 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环后, 72 °C 10 min, 4 °C 保存。扩增产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳后, 切取目的条带, 使用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化后, 进行 TA 克隆并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

以上试剂和试剂盒均购自生工生物工程(上海)

股份有限公司。

1.2.2 序列分析及系统进化树的构建 采用 Mega 5.0 软件(汪琛颖等,2011)对序列进行比对、人工调整及碱基分析;采用 PAUP \* 4.0b4a 软件(Swofford,2003)以最大简约法(maximum parsimony, MP)和最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树。MP 分析采用启发式搜索的方式,分支交换算法设定为树二等分再连接算法(tree bisection reconnection);ML 分析采用启发式搜索的逐步加入式算法(stepwise addition),分支交换算法设定为最近邻居互换法(nearest neighbor interchange, NNI),运算均取其严格一致性树。这两种树的拓扑结构的节点支持率均由 1 000 次重复的自展检验(bootstrap, BP)分析得到(张青等,2010)。

## 2 结果与分析

### 2.1 席藻样品 ITS 序列扩增及序列测定

本实验室 4 株席藻样品提取基因组 DNA 后,采用特异引物 322、340 进行 ITS 序列的 PCR 扩增。图 1 为 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果,显示其 ITS 序列 PCR 产物(含有 16S rDNA-3' 端和 23S rDNA-5' 端部分序列)均为单一条带, *Phormidium* sp. 6A10 和 *Phormidium* sp. 7D6 的条带大小为 600 bp, *Phormidium* sp. 7B10 和 *Phormidium* sp. 8B8 的条带大小为 700 bp。经过序列测定, *Phormidium* sp. 6A10、*Phormidium* sp. 7B10、*Phormidium* sp. 7D6、*Phormidium* sp. 8B8 的 ITS 序列大小(去除 16S rDNA-3' 端和 23S rDNA-5' 端)分别为 429 bp、513 bp、424 bp、508 bp, *Phormidium* sp. 6A10、*Phormidium* sp. 7D6 的 ITS 序列仅携带 tRNA<sup>Ile</sup> 编码区,为 ITS-I 型,而 *Phormidium* sp. 7B10、*Phormidium* sp. 8B8 则同时携带 tRNA<sup>Ile</sup> and tRNA<sup>Ala</sup> 编码区,为 ITS-IA 型。4 株席藻样品的 ITS 序列均已提交至 Genbank, *Phormidium* sp. 6A10、*Phormidium* sp. 7B10、*Phormidium* sp. 7D6、*Phormidium* sp. 8B8 的接受号分别为 KF681511、KF751350、KF681512、KF751351。

### 2.2 席藻属 ITS 多序列比对分析

考虑到本实验室席藻样品的 ITS 序列均为单一拷贝类型,另从基因库甄选 12 株具单一拷贝类型的席藻属的 ITS 序列(其中 9 株 ITS-IA 型,3 株为 ITS-I 型,具体样品信息见 1.1 中表 1)。采用 MEGA

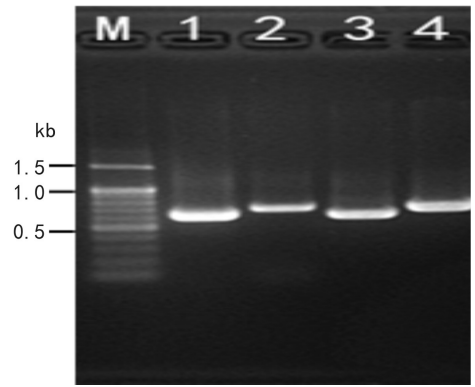


图 1 席藻样品 ITS PCR 产物电泳分析  
M. 分子量标准(100 bp DNA 梯度量标);  
泳道 1-4 分别为 J1、J2、J3、J4。

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of ITS of *Phormidium* samples M. Molecular weight marker (100 bp plus DNA ladder marker); Lane 1-4 represented J1, J2, J3, J4.

5.0 软件进行多序列比对以及人工校正,发现席藻的 ITS-IA 型和 ITS-I 型序列均出现了 Iteman *et al.*(2000)、Sarah *et al.*(2001)所描述的保守区域 D1、D1'、D2、D3、tRNA<sup>Ile</sup>、D4、BoxA、D5, ITS-IA 型的 ITS 序列具有 tRNA<sup>Ala</sup> 编码区,而 ITS-I 型无此编码区。

### 2.3 席藻 ITS-IA 和 ITS-I 型序列之间进化关系研究

以 *Microcoleus vaginatus* clone 205-4C、*Microcoleus vaginatus* clone 205-5D 为外群组构建 MP 和 ML 树。构树的 ITS 序列的相关信息见 1.1 中表 1。由于 ITS-IA 型和 ITS-I 型两种拷贝类型存在 tRNA<sup>Ala</sup> 编码区的差异,针对 tRNA<sup>Ala</sup> 编码区序列我们采用缺失和插入两种方式进行处理。

图 2 和图 3 为采用缺失处理方式得到的 MP 和 ML 树。基于 ITS 序列的 MP 树(图 2)显示, ITS-IA 型和 ITS-I 型的种类各自聚为一个组, ITS-IA 型形成组 I, ITS-I 型形成组 II, 且组 I 的节点较组 II 出现的早。ML 树(图 3)与 MP 树显示了较为一致的结果,与 MP 相同 ITS-IA 型种类聚为组 I, 其中包括与 MP 相同的 III、IV、V 小组,但在小组 III 的内部以及小组 III、IV、V 之间的位置分布上略有差异,而 ITS-I 型种类聚成的组 I 结构与 MP 树中完全一致。

将 tRNA<sup>Ala</sup> 编码区作为插入序列处理,得到的 MP 树(图 4)与图 2 结构基本一致,但在组 III 的内部分布上略有差异。其 ML 树(图 5)与图 3 结构也

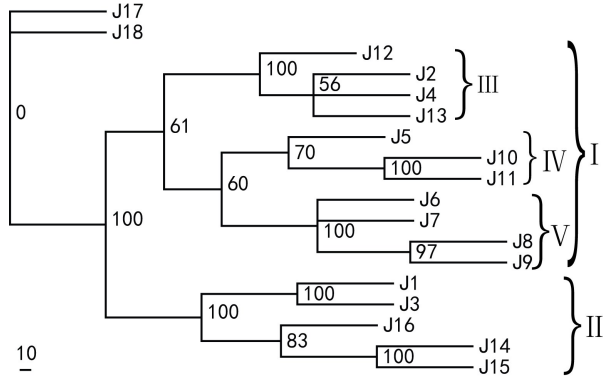


图 2 采用缺失处理所得 MP 树

Fig. 2 MP tree by using the lack treatment (CI=0.781; RI=0.830)

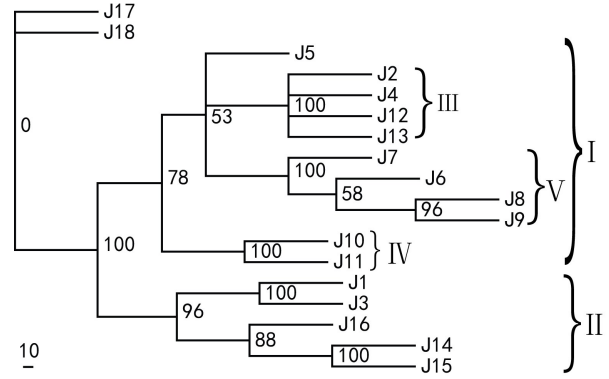


图 5 采用插入处理所得 MP 树

Fig. 5 MP tree by using inserted treatment (CI=0.746; RI=0.785)

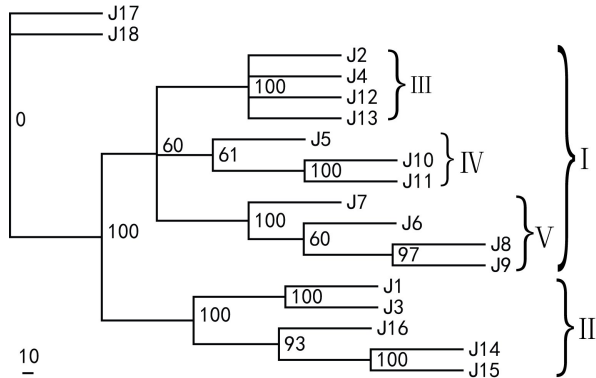


图 3 采用缺失处理所得 ML 树

Fig. 3 ML tree by using the lack treatment (CI=0.767; RI=0.810)

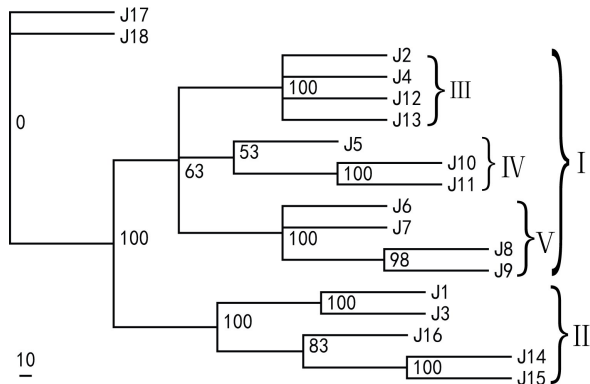


图 4 采用插入处理所得 MP 树

Fig. 4 MP tree by using inserted treatment (CI=0.760; RI=0.805)

有 ITS-IA 型种类形成的组 I 中。

两种处理方式得到的所有系统发育树均显示 ITS-IA 型和 ITS-I 型的种类各自聚为一组, ITS-IA 型为组 I, ITS-I 型为组 II, 且组 I 的节点较组 II 出现的早。结果显示席藻属的 ITS-I 型极有可能是由其原来的 ITS-IA 型缺失 tRNA<sup>Ala</sup> 编码区而来。

### 3 讨论与结论

*Nostoc* PCC 7120 的 ITS 序列有两种拷贝类型即 ITS-IA、ITS-N, *Synechocystis* PCC 6803 则只有一种拷贝类型, 拷贝类型为 ITS-IA (Iteman *et al.*, 2000)。史全良等 (2005) 对地衣共生念珠藻 ITS 序列的研究发现除了出现与 *Nostoc* PCC 7120 相同的两种拷贝以外, 还发现有一条长度 920 bp 的拷贝, 经粟绒 (2013) 进一步研究发现该条带的出现为假阳性, 是其 ITS-IA 和 ITS-N 条带形成的异源双链, 并认为在协同进化的过程中, 蓝藻的不同类型的 ITS 序列很可能是其中一种类型的 ITS 序列之间相互趋异而形成的异质性排列, 即 ITS-N 型很可能是由其 ITS-IA 型缺失 tRNA 编码序列而来, 而并未对 ITS-I 型与 ITS-IA 型的进化关系进行分析。

以往的研究 (Taton *et al.*, 2006; Otakar *et al.*, 2011; Marquardt *et al.*, 2007) 显示席藻属 ITS 序列的 PCR 产物有单一条带和多条带两种情况: 即单一条带 (仅出现 ITS-IA 或 ITS-I) 和两条条带 (同时出现 ITS-IA 和 ITS-N), 其中以单一条带的 ITS-IA 型最为常见。本文结果显示采集于中国苏州的四株席藻属样品, 其 ITS 序列均为单一条带, 但为两种

大致相同, 原来在小分组 IV 中的 *Phormidium* sp. CCMEE327 与 *Phormidium priestleyi* ANT.LG2.4 和 *Phormidium priestleyi* LH66.1 分开, 但仍在所

不同的拷贝类型,其中 6A10、7D6 的 ITS 拷贝类型为 ITS-I 型,7B10、8B8 则属于 ITS-IA 型;在基于 ITS 序列建立的系统发生树中,ITS-IA 型和 ITS-I 型的种类各自聚为一个组群,且 ITS-IA 型的组群节点较 ITS-I 型出现的早,表明席藻属 ITS-I 型极有可能是由其原来的 ITS-IA 型缺失 tRNA<sup>Ala</sup> 编码区进化而来,ITS-IA 型应为蓝藻 ITS 的基本结构。席藻属的 ITS 序列的分布情况是较为复杂的,其 ITS 序列的缺失机理还有待于进一步研究。

## 参考文献:

- Baker JA, Entsch B, McKay DB. 2003. The cyanobiont in an Azolla fern is neither *Anabaena* nor *Nostoc* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, **229**(1):43-47
- Chen YQ(陈月琴), Tang SQ(唐绍清), He JW(何家堯), et al. 1999. Sequence analyses of rDNA intergenic spacer region from Oscillatoriaceae (*Cyanobacteria*) and its taxonomic significance (蓝藻 Oscillatoriaceae rDNA 16S-23S 基因间隔区的序列分析及其分类学意义)[J]. *Plant Div Res*(植物分类与资源学报), **21**(1):81-86
- Ferris MJ, Kuhl M, Wieland A, et al. 2003. Cyanobacterial ecotypes in different optical microenvironments of a 68 °C hot spring mat community revealed by 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region variation [J]. *Appl Environ Microb*, **69**(5):2 893-2 898
- Garcia MJ, Martinez MA, Anton AI, et al. 1996. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR Collection and *E. coli* K-12 [J]. *J Bacteriol*, **178**(21):6 374-6 377
- Iteman I, Rippka R, Marsac N, et al. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria [J]. *Microbiology*, **146**(6):1 275-1 286
- Jürgen Marquardt, Katarzyna A, Palinska. 2007. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different Habitats and geographical sites [J]. *Arch Microbiol*, **187**:397-413
- Karina S, Alejandro AM, Katia SL, et al. 2009. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains [J]. *Syst Appl Microbiol*, **32**:37-48
- Nellssen BA, Wilmotte A, Neefs JM, et al. 1994. Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis [J]. *Syst Appl Microbiol*, **17**:206-210
- Otakar Strunecký, Josef Elster, Jiří Komárek. 2011. Taxonomic revision of the fresh-water cyanobacterium, *Phormidium "murrayi"* = *Wilmottia murrayi* [J]. *Fottea (Praha)*, **11**(1): 57-71
- Otsuka S, Suda S, Li R, et al. 1999. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence [J]. *FEMS Microbiol Lett*, **172**(1):15-21
- Sarah L, Valerie R, Jeffrey R, et al. 2001. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria [J]. *Mol Biol Evol*, **18**(6):1 057-1 069
- Shi QL(史全良), Bo FM(卜复鸣), Han M(韩梅). 2005. The primary study on multicopy of ITS sequences of *Nostoc* in lichens (地衣中共生念珠藻多拷贝序列的初步分析) [J]. *J Suzhou Univ: Nat Sci Edit* (苏州大学学报·自然科学版), **21**(4):75-79
- Su R(粟绒). 2013. Analyses on multicopy of 16srDNA-23 SrDNA ITS sequences of cyanobacteria (蓝藻 16SrRNA-23SrRNA 基因间隔区序列 (ITS) 多拷贝分析) [D]. Suzhou (苏州): Soochow University (苏州大学医学部基础医学与生物科学学院):19-27
- Swofford DL. 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other Methods) [M]. version 4.0. *Sunderland: Massachussets*, 220-260
- Taton A, Grubisic S, Ertz D. 2006. Polyphasic study of antarctic cyanobacterial strains [J]. *J Phycol*, **42**(6):1 257-1 270
- Wang CY(汪琛颖), Li LB(李利博), Zhao JC(赵建成). 2011. ITS sequences analysis of nuclear ribosomal DNA of *Bryum yunnanense* and *B. capillare* (云南真藓和细叶真藓的核糖体 DNA ITS 序列分析) [J]. *Guihaia* (广西植物), **31**(1):25-30
- Zhang Q(张青), Shi QL(史全良). 2010. Isolation and identification of phycobiont from foliose lichens on different growth matrixs (不同生长基质中叶状地衣共生藻的分离与鉴定) [J]. *Ecol Environ Sci* (生态环境学报), **19**(12):2 850-2 856