

# 五种大戟属植物 nrDNA 的 ITS 序列分析 及其叶的比较解剖学研究

孟娜<sup>1</sup>, 周守标<sup>1\*</sup>, 蒋继宏<sup>2</sup>

(1. 安徽师范大学 生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 江苏省药用植物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

**摘要:** 运用 PCR 直接测序法和石蜡切片法, 测定 5 种安徽产大戟属植物的 nrDNA 的内转录间隔区(ITS)序列包括 5.8S rDNA 及其叶片的解剖。结果表明:(1)5 种大戟属植物的 ITS 的长度范围为 641~662 bp, 运用 Mega 软件构建 ITS 树把 5 种植物归为两大支:大戟、月腺大戟与乳浆大戟聚为一支;地锦和斑地锦聚为另一支。结果表明:地锦和斑地锦亲缘关系较近,而大戟、月腺大戟和乳浆大戟亲缘关系较近。(2)5 种大戟属植物的叶片结构中,除地锦和斑地锦外,其余 3 种有明显的栅栏组织和海绵组织之分,但二者在叶肉中的厚度比在种间有一定的差别;而地锦和斑地锦叶的栅栏组织与海绵组织分化不明显,且皆有乳汁管,其他 3 种植物叶片内未见此结构,叶片结构分析表明:大戟、月腺大戟和乳浆大戟叶片结构相近,而地锦草和斑地锦叶片结构也相近。(3)分析表明 nrDNA 的 ITS 序列及叶的比较解剖特征具有明显的相关性。以上研究结果为大戟属植物的分类和药用开发提供了实验证据。

**关键词:** 大戟属; ITS 序列; 比较解剖学

**中图分类号:** Q944.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0018-04

## Sequence analysis based on ITS region of nuclear ribosomal DNA and comparative anatomy on the leaves of five species in *Euphorbia*

MENG Na<sup>1</sup>, ZHOU Shou-biao<sup>1\*</sup>, JIANG Ji-hong<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China; 2. Key Laboratory of Medicine Plant and Biotechnology, Xuzhou 221116, China)

**Abstract:** The sequence of ITS region(ITS1-5.8S-ITS2)of nuclear ribosomal DNA from 5 species of genus *Euphorbia* was determined using PCR products and the leaf structure was examined by anatomical method. The results are as follows:(1)The length of ITS region ranges from 641 bp to 662 bp. Two clades of five species, with one including *E. pekinensis*, *E. ebracteolata*, *E. esula*, and the other including *E. humifusa* and *E. supina*, are identified. The result shows that there is a close relationship between *E. humifusa* and *E. supina*, and similarly, there is a close relationship among *E. pekinensis*, *E. ebracteolata* and *E. esula* by direct sequencing of PCR products. (2)Except *E. humifusa* and *E. supina*, the leaves of *E. pekinensis*, *E. ebracteolata* and *E. esula* are differentiated into the palisade tissue and the spongy tissue, but the thickness of leaves and percentage of palisade and spongy tissue are different among species. They have nonarticulate laticifer and the structure is similar between palisade and spongy tissue. It is indicated that the leaf structure of *E. humifusa* and *E. supina* is similar and that of *E. pekinensis*, *E. ebracteolata* and *E. esula* is alike. (3)The analysis shows that there is

收稿日期: 2004-11-01 修回日期: 2005-08-28

基金项目: 安徽省自然科学基金(00042415)资助[Supported by Natural Science Foundation of Anhui Province(00042415)].

作者简介: 孟娜(1977-),女,安徽省宿州人,硕士研究生,植物分类学专业, E-mail: <angnem@163.com>.

\* 通讯作者(Author for correspondence)

the relevance between ITS sequence and comparative anatomical character of the leaves.

**Key words:** *Euphorbia*; ITS sequence; comparative anatomy

大戟属(*Euphorbia*)为大戟科(Euphorbiaceae)中最大的属,全世界有 2000 余种,安徽产 6 个野生种。大戟属植物资源丰富,从热带到亚热带,从陆地到沙漠,皆有分布,本属植物含白色或黄白色乳汁,具有重要的药用价值(钱啸虎,1988)。目前对大戟属植物研究主要集中在对其化学成分及药理方面。浮光苗等(2003)研究了月腺大戟的化学成分,从中分离出 7 个化合物;孔令义等(1996)从大戟根中分离出 9 个化合物;刘湘新等(1996)对地锦有效成分进行鉴定,为兽医临床合理使用地锦提供实验依据;柳润辉等(2001)为进一步寻找斑地锦的抗菌活性物质,对斑地锦进行了化学成分分析,从中分离得到 9 个化合物,并鉴定了其理化性质。但在 nrDNA 的 ITS 序列测定及叶的解剖学特征尚未见报道。本文首次报道了安徽产 5 种大戟属植物 nrDNA 的 ITS 序列分析及其叶的解剖学研究,为探讨大戟属植物的系统演化关系提供分子和解剖学证据;同时为大戟属植物的分类和药用开发提供实验证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

本研究所用材料,均采自安徽省,详见表 1。

表 1 材料来源  
Table 1 The origin of materials

种名 Species	采集地 Locality	采集人 Collector	材料及标本号 No.
大戟 <i>E. pekinensis</i>	琅琊山	孟娜等	0301
月腺大戟 <i>E. ebracteolata</i>	琅琊山	孟娜等	0302
乳浆大戟 <i>E. esula</i>	芜湖	孟娜等	0303
地锦 <i>E. humifusa</i>	繁昌	周守标等	0304
斑地锦 <i>E. supina</i>	繁昌	周守标等	0305

### 1.2 nrDNA 的 ITS 序列

用于 DNA 提取的材料均为新鲜叶片,总 DNA 提取方法为 CTAB 法(马兵钢等,2000)。PCR 反应过程及所用引物参照王建波(1999)。PCR 扩增产物用 Wizard™ PCR Preps DNA Purification System(Promega 公司)纯化后直接作为测序模板。测序工作在中科开瑞芯片股份有限公司的 DNA 自动测序仪上完成。每种植物的 ITS 序列均用 P1 和 P4 引物正反链测定,保证序列测定的准确性,所得的

ITS 序列包括 5.8SrDNA。序列经用互补链校对后,参照 GenBank 上检索号为 AF537546 的序列确定非编码的 ITS1 和 ITS2 的边界。序列排列用 Clustal X 程序进行对位排列;进一步用人工核对排列。持排好的序列运用 Maga 软件构件 ITS 树,进行系统发育分析,并用自展法(bootstrap)进行检测,自展数据集为 1 000 次结果。

### 1.3 叶的形态解剖

选择正常植株上的完整成熟叶片(第 3 片叶),剪取叶中部 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,用 FAA 固定,采用常规石蜡切片法,切片厚度为 12 μm,番红—固绿对染,中性树胶封片,然后在 OLYMPUS 显微镜下观察和拍照。

## 2 实验结果

### 2.1 ITS 序列分析结果

本文测定了 6 种大戟属植物的 ITS(包括 ITS1,5.8SrDNA,ITS2)序列(含栽培种一品红),用人工核对排列,持排好的序列运用 Maga 软件构件 ITS 树,进行系统发育分析,并用自展法(bootstrap)进行检测,自展数据集为 1 000 次结果详见图 1。如图 1 可知,大戟、月腺大戟和乳浆大戟归为一大支,而地锦与斑地锦归为另一大支,其中的一品红(*E. pulcherrima*)为栽培种,在此不做分析。

### 2.2 叶片解剖特征观察结果

5 种大戟属植物叶片厚度在 104~227 μm 之间,都由表皮、叶肉和叶脉构成,其中大戟、月腺大戟和乳浆大戟叶片结构较相似,表皮为一层长方形、圆形细胞;栅栏组织为一层含较多叶绿素的近长柱形细胞,海绵组织为 4~5 层排列较疏松的细胞;但三者的厚度比、排列密度及疏松程度不同,大戟、月腺大戟栅栏组织排列稍疏松,海绵组织排列也疏松,栅栏组织与海绵组织厚度比分别为 0.77 与 1.0;乳浆大戟栅栏组织与海绵组织细胞排列紧密,栅栏组织与海绵组织厚度比分别为 1.43(表 2 和图 2-8)。而地锦和斑地锦叶片结构明显不同于以上三种植物,在栅栏组织和海绵组织之间,可以看到许多呈椭圆形或近圆形的乳汁管,乳汁管由一层原生质浓厚,染色较深的分泌细胞包围,外围由数层鞘细胞围绕,它

们构成一种特殊结构。

### 3 分析与讨论

通过 ITS 序列分析,结合解剖学研究,可以得到以下结论:

(1)通过 ITS 序列分析结果表明,所研究的大

戟属 5 个类群可分为两大支。其中地锦和斑地锦为一分支,其具有强的支持率(100%),说明两者的亲缘关系很近。而大戟、月腺大戟和乳浆大戟具有 93%较强的支持率而聚为一类,也有较近的亲缘关系,其中大戟和月腺大戟间的亲缘关系较乳浆大戟更近。

(2)从叶片内部结构观察结果可以看出大戟、月

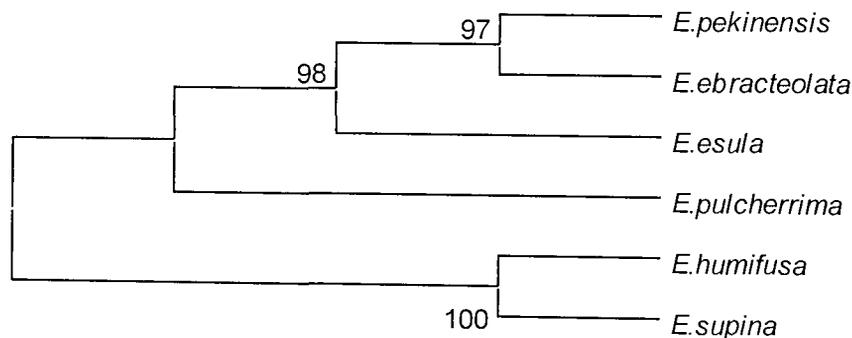


图 1 基于 ITS 区序列分析得到的系统树

Fig. 1 The parsimonious trees based on sequences of ITS

分支上的数字是 1 000 次重复抽样检测的 bootstrap 值

Sequence numbers above branches are bootstrap values (%) of 1 000 replications

表 2 大戟属叶片的解剖特征比较

Table 2 The comparison of leaf anatomy of *Euphorbia*

种名 Species	TL ( $\mu\text{m}$ )	UE		LE		PT			ST		TPT : TST	
		LC	TCE ( $\mu\text{m}$ )	LC	TCE ( $\mu\text{m}$ )	LC	TCE ( $\mu\text{m}$ )	排列 A	LC	TCE ( $\mu\text{m}$ )		排列 A
大戟 <i>E. pekinensis</i>	104~132	1	8~12	1	4~8	1	40~2	C-L	多层	52~60	L	0.77
月腺大戟 <i>E. ebracteolata</i>	167~221	1	16~23	1	15~22	1	68~84	C-L	多层	68~92	L	1.0
乳浆大戟 <i>E. esula</i>	172~227	1	28~40	1	8~23	1	80~92	C	多层	56~72	C-L	1.43
地锦草 <i>E. humifusa</i>	116~140	1	12~16	1	8~20	1~2	20~24	C	2~3	16~20	L	1.22
斑地锦 <i>E. supina</i>	150~165	1	16~20	1	24~28	1~2	28~32	C	2~4	20~24	L	1.36

注: UE=upper epiderm=上表皮;LE=lower epiderm=下表皮;PT=palisade tissue=栅栏组织;ST=spongy tissue=海绵组织;TL=thickness of leaves=叶片厚度;LC=layer of cells=细胞层数;TC=thickness of cells=细胞厚度;TPT=thickness of palisade tissue=栅栏组织厚度;TST=thickness of spongy tissue=海绵组织厚度;C=compact=紧密;L=loose=疏松。

腺大戟和乳浆大戟叶片结构较相似,其中大戟、月腺大戟结构更为接近,而地锦和斑地锦的叶片结构也相似,此结果与 ITS 序列分析结果相一致。

总之,本实验通过植物 nrDNA 的 ITS 序列及叶的比较解剖学两方面对 5 种大戟属植物进行分析和研究,所得结果完全吻合,为进一步开发和利用该属植物的系统分类研究提供了新依据。

#### 参考文献:

刘湘新,孙志良,冯琦华,等. 1996. 地锦草有效成分鉴定及其抑菌试验[J]. 中国兽医科技,26(7):30-31.

柳润辉,孔令义. 2001. 斑地锦的化学成分[J]. 植物资源与环境学报,10(1):60-61.

钱啸虎. 1988. 安徽植物志(第三卷)[M]. 北京:中国展望出版,256-257.

Fu GM(浮光苗),Yu BY(余伯阳),Zhu DN(朱丹妮). 2003. Studies on the chemical constituents of *Euphorbia ebracteolata*(月腺大戟化学成分的研究)[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报),34(4):377-379.

Kong LY(孔令义),Min ZD(闵知大). 1996. Studies on chemical constituents of roots of *Euphorbia pekinensis*(大戟根化学成分的研究)[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报),31(7):524-529.

Ma BG(马兵钢),Zhao ZS(赵宗胜),Feng JR(冯建荣),et al.

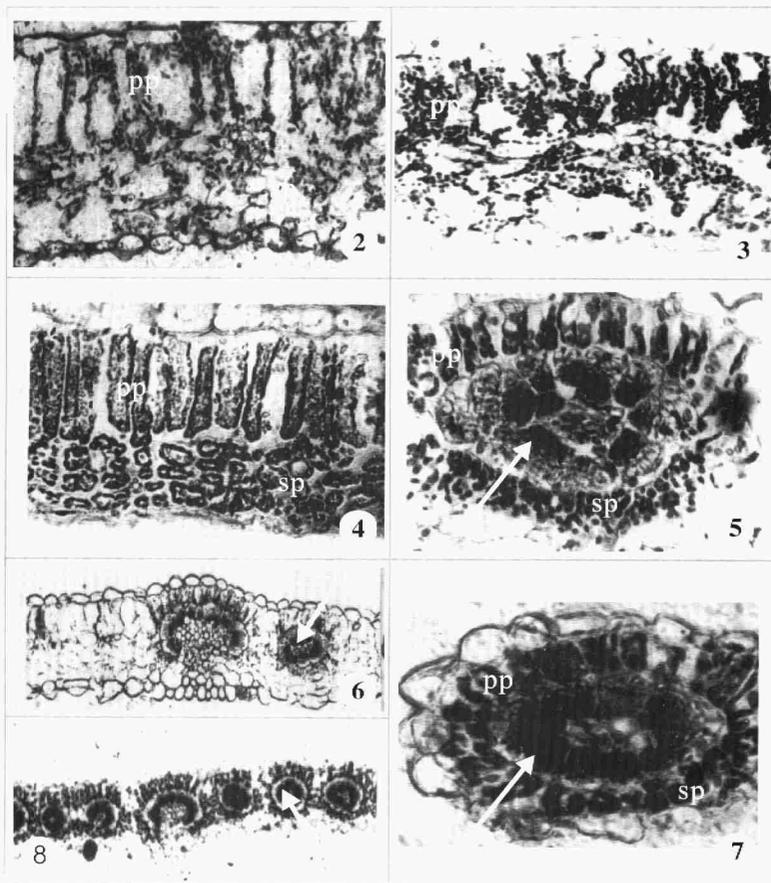


图 2-8 n=乳汁管=nonarticulate laticifer; ep=表皮=epidermis; pp=栅栏组织=palisade parenchyma; sp=海绵组织=spongy parenchyma; st=stoma.

2. 大戟×400; 3. 月腺大戟×430; 4. 乳浆大戟×400; 5. 斑地锦×400;

6. 斑地锦×100; 7. 地锦草×400; 8. 地锦草×100.

Figs. 2-8 2. *E. pекinensis*×400; 3. *E. ebracteolata*×400; 4. *E. esula*×400; 5. *E. supina*×400;

6. *E. supina*×100; 7. *E. hami fusa*×400; 8. *E. hami fusa*×100.

2000. A comparison of DNA extraction methods in *Pyrus* (梨属 DNA 提纯方法的比较研究)[J]. *J. Shizhezi Univ(Nat Sci)*(石河子大学学报(自然科学版)), 4(4): 277-279.  
Wang JB(王建波), Zhang WJ(张文驹), Chen JK(陈家宽).

1999. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms(核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用)[J]. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 37(4): 407-416.