

· 研究报告 ·

山茶属植物ITS的多态性——一个广泛逃离一致性进化的实例

徐颖¹, 徐晶^{1,3}, 高继银^{2,4}, 张文驹^{1*}

¹复旦大学生命科学学院生物多样性科学研究所, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433

²广东棕榈风景园林科学研究院, 中山 528416; ³中国科学院上海生命科学信息中心, 上海 200031

⁴中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 富阳 311400

摘要 利用位于45S rDNA内转录间隔区(ITS)的3对SSR引物, 对山茶属(*Camellia* L.)的40个物种进行PCR扩增, 检测3个SSR位点的多态性, 研究物种倍性与多态性之间的关系。实验结果显示, 37个种(占92.5%)的ITS片段存在个体内长度多态性, 在这些种类的个体内至少有2–6类ITS拷贝, 表明山茶属植物的ITS片段存在广泛的非一致性进化; ITS序列上存在易于滑动的SSR位点, 并且其基因组中有较多位于不同染色体上的rDNA位点, 这很可能是山茶属植物ITS片段存在广泛多态性的原因。然而, 研究中没有发现多倍体种类ITS片段的多态性显著高于二倍体种类。山茶属植物ITS片段的多态性提示该属植物的rDNA可能存在更为复杂的进化模式, 在利用ITS片段解决该属植物的系统分类问题时应更为谨慎。

关键词 山茶属, 一致性进化, 多态性, rDNA ITS

徐颖, 徐晶, 高继银, 张文驹 (2011). 山茶属植物ITS的多态性——一个广泛逃离一致性进化的实例. 植物学报 46, 162–169.

高等植物的45S rDNA是一个被广泛研究的多基因家族, 在高等植物中其拷贝数高达 10^3 – 10^5 (Brown et al., 1972; Long and Dawid, 1980)。这些拷贝在基因组内串联重复、成簇存在(Brown et al., 1972; Long and Dawid, 1980), 分布于基因组的一个至多个位点上(Long and Dawid, 1980; Pedersen and Linde-Laursen, 1994)。每一个重复单元包括3个rRNA基因(18S rRNA、5.8S rRNA和26S rRNA), 基因之间由内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS1和ITS2)隔开。rDNA基因家族的进化模式十分特殊, 来自同一种内的rRNA基因家族的重复单元彼此间十分相似, 并且这种相似性程度远高于“直系同源”的其它物种间的重复单元(Zimmer et al., 1980)。该模式使得同一基因组内的rDNA重复单元保持高度的一致性, 这一特殊的进化式样被称为一致性进化(concerted evolution)(Dover, 1982; Ohta and Dover, 1984)。多年来大量研究都支持rRNA基因家族一致性进化的模式(Hillis et al., 1991; Wendel et al., 1995; Kovarik et al., 2005; Eickbush and Eickbush, 2007)。最近, Ganley

和Kobayashi(2007)使用鸟枪法对5个真菌物种进行全基因组测序, 结果表明, 这5种真菌的rDNA间差异很小, 一致性进化有效地维持着重复序列间的高度相似性。驱动一致性进化的分子机制包括不等交换(unequal crossover)、基因转换(gene conversion)和基因扩增(gene amplification)等(Zimmer et al., 1980; Arnheim et al., 1980; Dover, 1982; Hillis et al., 1991)。

核糖体rDNA中的18S、5.8S和26S基因序列进化缓慢而且相对保守, 但位于这3个基因序列之间的转录间隔区(ITS)序列的变异速度却较快, 且ITS进行一致进化, 在同一基因组内的拷贝高度一致, 便于对PCR扩增产物进行直接测序(Bailey et al., 2003)。ITS序列的这些特点使得它成为现今被子植物系统学研究中最常用的分子标记之一(Baldwin et al., 1995; Álvarez and Wendel, 2003), 被广泛应用于系统发育研究中, 特别是分析较低等级分类群的亲缘关系、认识杂交和异源多倍体以及探讨多倍体进化等许多系统与进化研究的关键问题。此外, 它在种级水平上有作为DNA条形码的潜力(任保青和陈之端, 2010)。根

收稿日期: 2010-09-17; 接受日期: 2011-01-11

基金项目: 973 计划(No.2007CB411600)

* 通讯作者。E-mail: wjzhang@fudan.edu.cn

据Keller等(2006)的统计, 2000–2006年间共发表了超过3 000篇涉及不同物种rDNA序列的研究论文。

然而, 近年来越来越多的研究发现ITS序列在某些物种内甚至个体内都存在多态性(马长乐和周浙昆, 2006; Xiao et al., 2010)。特别是Keller等(2006)发现, 在*Podisma pedestris*的不同个体中包含了許多高度趋异进化的rDNA重复单元, 且这些趋异的rDNA家族在*Podisma*家系中共存了至少1 100万年。在植物中, Zheng等(2008)对梨属(*Pyrus* L.)19个物种进行了研究, 发现其ITS区域(ITS1、5.8S和ITS2)内存在不同程度的个体内多态性。但是, 这是在1个属内个别种出现的特例还是广泛分布的事件, 尚有待进一步研究。

山茶属(*Camellia* L.)是山茶科(Theaceae)中最大的属。按照不同的分类系统, 目前全世界该属物种有约120–300种(张宏达和任善湘, 1998; 闵天禄, 2000)。但是一直以来, 对山茶属植物的种类划分以及系统发育关系存在较多的争议(张宏达和任善湘, 1998; 闵天禄, 2000)。作为最常用的分子标记, ITS序列被众多研究者选择用于解决山茶属系统分类中的难题(唐绍清等, 2004; 杨俊波等, 2006), 但在应用中遇到了许多困难, 问题之一是很难对一些山茶种类的ITS片段的PCR扩增产物进行直接测序。最近, 邹稚华等报道了山茶属中ITS片段应用技术上的困难与解决方法, 发现山茶属个别种类的ITS片段有多态性(Vijayan and Tsou, 2008)。

在我们的前期研究中, 曾对山茶(*C. japonica*)的rDNA进行测序, 结果表明, ITS序列上存在若干山茶属植物特有的SSR(simple sequence repeat)位点, 这为检测ITS在个体内的长度多态性提供了机会。本实验以山茶属植物为研究对象, 针对ITS上特有的SSR位点进行扩增, 检测ITS在山茶属物种内是否存在广泛的长度多态性, 以期揭示rDNA在山茶属中的进化模式, 并阐明倍性水平的差异与ITS长度多态性间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选取山茶属的40个物种作为代表, 它们分属于张宏达分类系统18组中的14组和闵天禄分类系统14组中的9组, 包含不同倍性的种类。物种编号及来

源地见表1, 大多数材料为浙江金华国际山茶物种园引种栽培的个体。供提取总DNA的实验材料绝大多数采自活体植物, 采摘后置于适量硅胶中干燥, 常温条件下保存。材料的具体情况参见表1。

1.2 DNA提取、引物设计、PCR扩增及多态性检测

新鲜植物材料经变色硅胶充分干燥后用于DNA提取。采用CTAB法(Doyle and Doyle, 1987)提取植物总DNA。引物(表2)由本实验室自行开发(Xu et al., 2009), 上海生工生物工程有限公司合成。

PCR扩增使用上海申能博彩生物科技有限公司的Taq酶, 体系按照说明书混合。扩增程序如下: 94°C预变性4分钟; 94°C变性30秒, 相应温度(见表2)退火1分钟, 72°C延伸30秒, 35个循环; 72°C延伸10分钟。PCR产物于4°C保存。

用4%的聚丙烯酰胺变性凝胶电泳检测PCR产物。电泳结束后取下凝胶进行银染显色, 先用双蒸水冲洗2遍, 然后放入盛有200 mL 0.1%AgNO₃溶液的染缸中染色10–15分钟。染色后转入双蒸水中洗涤2次, 然后将胶放入大约200 mL含有0.4%甲醛和1.5%NaOH的溶液中显色10分钟左右。染色和显色均在摇床上进行。胶显色后用双蒸水洗涤2次, 然后用数码照相机(Sony Inc.)拍照并记录。

2 结果与讨论

2.1 个体内的ITS序列长度多态性

PCR扩增及电泳结果见表1。用引物ITS-R1扩增, 三分之一的个体条带数大于1, 具有长度多态性, 其中*C. albogigas*有6条之多; 引物ITS-R2的扩增产物多态性相对较低, 约为10%, 其中*C. chekiangoleosa*等4个物种条带数较多, 达3条; 而在引物ITS-R3的扩增结果中, 超过90%的个体具有多态性, 比例极高, 其中*C. longtousanica*和*C. ilicifolia*两物种的条带数都多达6条。

因为以上这3对引物分别扩增ITS1-5.8S-ITS2这段序列的3个不同片段, 所以它们中任意1对的扩增产物出现多态即表示该物种的rDNA存在多态性。结果表明, 在本实验检测的所有40个物种中, 只有*C. huana*、*C. luteoflora*和*C. pubipetala* 3个物种的3对

表 1 实验材料及其来源、倍性及 3 对引物 PCR 扩增的条带数目

Table 1 Materials used in this study, their source region, ploidy and number of bands amplified by 3 pairs of primers

Taxon	Section ^a			Number of bands			Ploidy ^b	Sampling site	Collector(s)	Code
	Chang	Ming	ITS-R3	ITS-R1	ITS-R2	ITS-R3				
<i>Camellia albogigas</i> Hu	1	9	6	2	2	2	4x	Jinhua, Zhejiang ^c	W. J. Zhang	JH0909
<i>C. granthamiana</i> Sealy	1	9	1	2	2	3	4x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0901
<i>C. liberistyloides</i> Hung T. Chang	2	9	1	1	3	3	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0503
<i>C. yunnanensis</i> (Pitard ex Diels) Cohen Stuart	2	9	1	1	2	2	2x	Kunming, Yunnan	Q. Wang	WQ3-4
<i>C. lanceoleosa</i> Hung T. Chang	3	13	1	1	2	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0505
<i>C. oleifera</i> Abel	3	13	1	1	3	3	2x/6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH04064
<i>C. oleifera</i> Abel var. <i>confusa</i> (Craib) Sealy	3	13	1	1	3	3	-	-, Thailand	Maxwell, Mihi	T567
<i>C. furfuracea</i> (Merr.) Cohen-Stuart	4	9	1	1	2	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0506
<i>C. microphylla</i> (Merr.) S. S. Chien	5	13	3	1	1	1	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0563a
<i>C. luteoflora</i> Y. K. Li ex Hung T. Chang & F. A. Zeng	6	10	1	1	1	1	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH04076
<i>C. ilicifolia</i> Y. K. Li et Hung T. Chang	7	11	1	2	6	6	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0511
<i>C. trichocarpa</i> Hung T. Chang	7	9	1	1	2	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0510
<i>C. anlungensis</i> Hung T. Chang	8	11	1	2	2	2	2x	Ceheng, Guizhou	W. J. Zhang	04-069
<i>C. hupehensis</i> Hung T. Chang	8	11	2	3	3	3	-	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH 0518
<i>C. pyxidiacea</i> Z. R. Xu et al.	8	11	1	1	2	2	2x	Xingyi, Guizhou	W. J. Zhang	04-072
<i>C. tuberculata</i> S. S. Chien	8	11	1	1	2	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH 0512
<i>C. azalea</i> C. F. Wei	9	12	2	1	4	4	2x	Yangchun, Guangdong	W. J. Zhang	2-75
<i>C. chekiangoleosa</i> Hu	9	12	1	3	2	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0906
<i>C. compressa</i> Hung T. Chang et X. K. Wen	9	12	1	1	2	2	8x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0910
<i>C. cryptoneura</i> Hung T. Chang	9	12	1	1	2	2	6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0902
<i>C. hongkongensis</i> Seem.	9	12	4	1	3	3	2x	Hongkong	C. H. Tsou	T441
<i>C. japonica</i> L.	9	12	3	1	2	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0904

表 1 (续) Table 1 (continued)

Taxon	Section ^a			Number of bands			Ploidy ^b	Sampling site	Collector(s)	Code
	Chang	Ming		ITS-R1	ITS-R2	ITS-R3				
		ITS-R1	ITS-R2							
<i>C. lapidea</i> Y. C. Wu	9	12	1	1	2	4x/6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0908	
<i>C. magniflora</i> Hung T. Chang	9	12	1	1	2	6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0530a	
<i>C. phellocapsa</i> Hung T. Chang et B. K. Lee	9	12	3	1	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0528	
<i>C. pitardii</i> var. <i>yunnanica</i> Sealy	9	12	1	1	2	6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0905	
<i>C. polyodonta</i> F. C. How ex Hu	9	12	3	1	5	2x	Hangzhou Botanical Garden, Zhejiang	W. J. Zhang, Q. Wang	C10-1	
<i>C. reticulata</i> Lindl.	9	12	3	3	2	4x/6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0903	
<i>C. semiserrata</i> C. W. Chi	9	12	1	3	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang	JH0907	
<i>C. flava</i> (Pit.) Sealy	12	2	2	1	2	—	Tam Dao, Vietnam	W. J. Zhang	WJ-0512	
<i>C. huana</i> T. L. Ming et W. J. Zhang	12	2	1	1	1	2x	Ceheng, Guizhou	W. J. Zhang	04-070	
<i>C. pingguoensis</i> D. Fang	12	2	1	1	2	2x	Nanning Liangfeng River, Guangxi	F. Lu, Y. G. Wang	LW3-8	
<i>C. pubipetala</i> Y. Wan et S. Z. Huang	12	10	1	1	1	2x	Nanning Liangfeng River, Guangxi	F. Lu, Y. G. Wang	LW3-3	
<i>C. indochinensis</i> Merr.	13	2	1	1	2	2x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0538b	
<i>C. longipedicellata</i> (Hu) Hung T. Chang & D. Fang	13	5	2	1	3	—	Xincheng, Guangxi	W. J. Zhang et al.	C19-1	
<i>C. longipedicellata</i> (Hu) Hung T. Chang & D. Fang	13	5	1	1	3	—	Jinhua, Zhejiang ^d	W. J. Zhang et al.	JH0591	
<i>C. longfousanica</i> J. Y. Gao nom. nud.	14	4	1	1	6	—	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0552	
<i>C. kwangtungensis</i> Hung T. Chang	16	4	1	1	5	2x/6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0555	
<i>C. elongata</i> (Rehder et E. H. Wilson) Rehder	17	7	4	1	2	—	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0586	
<i>C. Forrestii</i> (Diels) Cohen-Stuart	17	7	1	1	3	2x/4x/6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH04062	
<i>C. Forrestii</i> (Diels) Cohen-Stuart	17	7	3	1	3	2x/4x/6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0567	
<i>C. fraterna</i> Hance	17	7	5	1	3	6x	Jinhua, Zhejiang	W. J. Zhang et al.	JH0566	

a: Chang 为张宏达分类系统, Ming 为闵天禄分类系统; b: 数据来自《世界山茶属的研究》; c: 金国际山茶物种园; d: 原产地为广西柳州

a: Two kinds of classification systems according to Chang Hungta (Chang) and Ming Tienlu (Ming) respectively; b: Data from Monograph of the Genus *Camellia*; c: Jinhua International Camellia Species Garden; d: Introduced from Liuzhou, Guangxi

表2 本实验中所用的引物序列

Table 2 Primer sequences used in this study

Code	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Annealing temperature	Source
ITS-R1	F:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' R:5'-GACARGTTCGCGGGTCGTY-3'	(CGGAA) ₅	Start from 62°C, -1°C per cycle until 53°C	Xu et al., 2009
ITS-R2	F:5'-AAGGAACCCGAACGAAGA-3' R:5'-ACGTGCCCTCAACCTAATG-3'	(A) ₇	58°C	Xu et al., 2009
ITS-R3	F:5'-CGTCTGCCTGGGCGTCT-3' R:5'-TTTGTCAACCACCACTCGTC-3'	(CG) ₄	58°C	This study

引物扩增条带数均为1, 其它物种都具有多态性。

2.2 个体间的ITS序列长度多态性

为了验证同物种的不同个体间ITS序列是否存在差异, 选取了2个物种的各2个个体进行检测。结果表明, 在引物ITS-R1片段内, *C. forrestii*的一个个体条带数为1, 无多态性, 另一个个体条带数为3; 同样在引物ITS-R1片段内, *C. longipedicellata*的2个个体的条带数也出现不同, 分别为2和1。在其它引物片段内, 则无差异。

2.3 不同倍性物种间ITS长度多态性的差异

将倍性确定的山茶属物种(表1)分为二倍体和多倍体(包括4x、6x、8x)2组, 分别在3对引物的扩增片段内比较其ITS长度多态性的差异。使用引物ITS-R1和ITS-R2扩增, 多倍体物种的条带数平均值(2.22、1.44)大于二倍体(1.54、1.33); 引物ITS-R3则相反, 二倍体的条带数均值(2.5)略大于多倍体(2.22)。对3对引物的扩增片段分别进行独立样本 t -检验(SPSS13.0), 结果表明, 二倍体和多倍体物种的条带数均不存在显著性差异($t=-0.976$, $P=0.353$; $t=-0.659$, $P=0.515$; $t=0.223$, $P=0.825$)。

2.4 讨论

实验材料包含张宏达分类系统18组中的14组40种, 样本量大、分布面广, 具代表性。在这些山茶属物种中, ITS存在多态性的比例高达93%, 说明ITS片段存在长度多态性的现象是广泛存在的, 而且ITS的多态性很高。以*C. japonica*为例, 其单倍型最少有3种(引物ITS-R1), 若引物ITS-R1和ITS-R3之间无连锁关系, 其单倍型可达 $3 \times 2 = 6$ 种。由此可见, 山茶属植物的个体内rDNA的变异很大, 非一致性进化的现象广

泛存在, 这与其它物种中普遍存在的rDNA进化模式不同。

那么究竟什么原因导致山茶属植物ITS序列具有如此高的多态性, 并且逃离一致性进化? 许多研究都表明, 位于同一条染色体的序列比位于不同染色体的位点间更容易发生一致性进化(Schlötterer and Tautz, 1994; Copenhaver and Pikaard, 1996; Polanco et al., 1998; Parkin and Butlin, 2004), 因为不等交换在姐妹染色体之间比非姐妹染色体之间更加频繁, 所以位点之间的基因重组频率要比位点内的低得多(Copenhaver and Pikaard, 1996; Zhang and Sang, 1999; Eickbush and Eickbush, 2007)。荧光原位杂交结果证明, 山茶属植物的rDNA上位点较多, 而且大都位于不同染色体上。如六倍体*C. reticulata*中有18个位点, 分布于18条染色体上; 二倍体*C. japonica*也有4个位点, 位于4条染色体上(Gu and Xiao, 2003)。山茶属植物rDNA上大量位点的存在, 可能会阻碍不等交换的发生, 并在一定程度上妨碍一致化的进程。有些位点可能已经变成假基因, 逃离一致性进化, 从而产生了多态性(Keller et al., 2006; 孙红正和葛颂, 2010)。

在我们的前期研究中发现, 山茶属植物的ITS序列上存在若干SSR位点, 在复制过程中, SSR位点处新生链和模板链容易发生滑动, 改变以前的排列顺序, 若DNA在此基础上继续合成, 那么微卫星重复的数量就会发生变化(Schlötterer and Tautz, 1992)。体外实验已经证明, 含有简单重复序列的DNA模板在复制时, DNA聚合酶有很高的滑动率, 如果错配修复机制效率不够高, 则在体内会出现较高的变异水平(Strand et al., 1993)。因此, 山茶属植物ITS序列中存在独特的SSR位点可能是导致其高度多态性的另一个原因。

此外, 山茶属植物多为异花授粉, 种间杂交非常普遍(Parks, 1990), 这可能也是导致ITS多态性的一个原因。杂交物种中, 不同的rDNA拷贝可能共存一定时间, 直到发生一致性进化(Wendel, 2000)。

除了个体内的多态性, 实验过程中我们还发现了个体间的ITS多态性。若同种个体在不同地域栽培, 则可能造成差异, 如本实验中的*C. longipedicellata*, 其2个个体一个采自广西忻城, 另一个为金华山茶物种园从柳州引种的个体, 它们的条带数也不相同。另外, 山茶属内存在广泛的多倍化现象(Kondo, 1977a, 1977b, 1978), 可能会造成同一物种不同个体间的多态性, 如在*C. forrestii*中, 二、四、六倍体均有发现, 若实验中的2个个体倍性不同, 则很有可能出现多态现象。

二倍体与多倍体条带数的统计结果表明, 3对引物*t*检验的*P*值都大于0.05, 二倍体和多倍体物种的条带数间不存在显著性差异, 即倍性与ITS序列多态性之间并没有相关性。这似乎与前面的解释存在一些矛盾, 因为染色体加倍后, 会出现更多位于非同源染色体上的位点(Campbell et al., 1997), 一致性进化的速率会降低, 应该有更高的多态性出现。本实验中并没有检测到这一现象, 这可能与多倍体物种的二倍体亲本有关(Campbell et al., 1997; Zheng et al., 2008), 因为进化时间不够长, 二倍体亲本尚未达到较高的一致性, 多态性较高, 故而导致部分倍性较低物种的多态性高于倍性高的物种。或者因为我们仅仅检测了ITS的长度多态性, 若进行进一步的测序分析, 获得更多的数据, 也许会有不同结果。

山茶属植物ITS片段逃离一致进化的特性, 特别是存在广泛的长度多态性, 应该是不能对其PCR产物进行直接测序的原因, 也使得依靠ITS序列来解决山茶属植物的系统分类问题变得困难和不确定。研究结果暗示高等植物rDNA基因家族的进化可能要比以往揭示的图景复杂得多, 依然需要开展深入研究。

致谢 本实验的样品采集工作得到复旦大学生命科学学院生物多样性科学研究所王玉国博士和陆帆先生的帮助, 特此致谢。

参考文献

马长乐, 周浙昆 (2006). ITS假基因对柞属系统学研究的影响

- 及其对分子系统学研究的启示. 云南植物研究 **28**, 127–132.
- 闵天禄 (2000). 世界山茶属的研究. 昆明: 云南科技出版社. pp. 4–308.
- 任保青, 陈之端 (2010). 植物DNA条形码技术. 植物学报 **45**, 1–12.
- 孙红正, 葛颂 (2010). 重复基因的进化——回顾与进展. 植物学报 **45**, 13–22.
- 唐绍清, 施苏华, 钟扬, 王燕 (2004). 基于ITS序列探讨山茶属金花茶组的系统发育关系. 广西植物 **24**, 488–492.
- 杨俊波, 李洪涛, 杨世雄, 李德铎, 杨莹燕 (2006). 四个DNA片段在山茶属分子系统学研究中的应用. 云南植物研究 **28**, 108–114.
- 张宏达, 任善湘 (1998). 中国植物志, 第49卷第3分册. 北京: 科学出版社. pp. 6–170.
- Álvarez I, Wendel JF (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol* **29**, 417–434.
- Arnheim N, Krystal M, Schmicke R, Wilson G, Ryder O, Zimmer E (1980). Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 7323–7327.
- Bailey CD, Carr TG, Harris SA, Hughes CE (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Mol Phylogenet Evol* **29**, 435–455.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* **82**, 247–277.
- Brown DD, Wensink PC, Jordan E (1972). A comparison of the ribosomal DNAs of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J Mol Biol* **63**, 57–73.
- Campbell CS, Wojciechowski MF, Baldwin BG, Alice LA, Donoghue MJ (1997). Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Mol Biol Evol* **14**, 81–90.
- Copenhaver GP, Pikaard CS (1996). Two-dimensional RFLP analyses reveal megabase-sized clusters of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*, suggesting local spreading of variants as the mode for gene homogenization during concerted evolution. *Plant J* **9**, 273–282.
- Dover G (1982). Molecular drive: a cohesive mode of spe-

- cies evolution. *Nature* **299**, 111–117.
- Doyle JJ, Doyle JL** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**, 11–15.
- Eickbush TH, Eickbush DG** (2007). Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* **175**, 477–485.
- Ganley ARD, Kobayashi T** (2007). Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res* **17**, 184–191.
- Gu ZJ, Xiao H** (2003). Physical mapping of the 18S-26S rDNA by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in *Camellia reticulata* polyploidy complex (Theaceae). *Plant Sci* **164**, 279–285.
- Hillis DM, Moritz C, Porter CA, Baker RJ** (1991). Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* **251**, 308–310.
- Keller I, Chintauan-Marquier IC, Veltsos P, Nichols RA** (2006). Ribosomal DNA in the grasshopper *Podisma pedestris*: escape from concerted evolution. *Genetics* **174**, 863–874.
- Kondo K** (1977a). Chromosome numbers in the genus *Camellia*. *Biotropica* **9**, 86–94.
- Kondo K** (1977b). Cytological studies in cultivated species of *Camellia* I. Diploid species and their hybrids. *Jpn J Breed* **27**, 28–38.
- Kondo K** (1978). Cytological studies in cultivated species of *Camellia* III. Tetraploid species and hybrids between diploid species and hexaploid species. *Jpn J Breed* **28**, 197–204.
- Kovarik A, Pires JC, Leitch AR, Lim KY, Sherwood AM, Matyasek R, Rocca J, Soltis DE, Soltis PS** (2005). Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two tragopogon allopolyploids of recent and recurrent origin. *Genetics* **169**, 931–944.
- Long EO, Dawid IB** (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **49**, 727–764.
- Ohta T, Dover GA** (1984). The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics* **108**, 501–521.
- Parkin EJ, Butlin RK** (2004). Within- and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion. *Mol Biol Evol* **21**, 1595–1601.
- Parks CR** (1990). Cross-compatibility studies in the genus *Camellia*. *Int Camellia J* **10**, 37–54.
- Pedersen C, Linde-Laursen I** (1994). Chromosomal location of four minor rDNA loci and marker microsatellite sequence in barley. *Chromosome Res* **2**, 65–71.
- Polanco C, González AI, de la Fuente Á, Dover GA** (1998). Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics* **149**, 243–256.
- Schlötterer C, Tautz D** (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* **20**, 211–215.
- Schlötterer C, Tautz D** (1994). Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Curr Biol* **4**, 777–783.
- Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD** (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**, 274–276.
- Vijayan K, Tsou CH** (2008). Technical report on the molecular phylogeny of *Camellia* with nrITS: the need for high quality DNA and PCR amplification with Pfu-DNA polymerase. *Bot Stud* **49**, 177–188.
- Wendel JF** (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* **42**, 225–249.
- Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T** (1995). Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 280–284.
- Xiao LQ, Möller M, Zhu H** (2010). High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes. *Mol Phylogenet Evol* **55**, 168–177.
- Xu J, Huang LD, Xu Y, Zhang WJ** (2009). Identification of hybrids of golden camellia using SSR molecular markers. *J Fudan Univ (Natural Science)* **48**, 668–673, 679.
- Zhang DM, Sang T** (1999). Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent *in situ* hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. *Am J Bot* **86**, 735–740.
- Zheng XY, Cai DY, Yao LH, Teng YW** (2008). Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus*. *Mol Phylogenet Evol* **48**, 892–903.
- Zimmer EA, Martin SL, Beverley SM, Kan YW, Wilson AC** (1980). Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 2158–2162.

Polymorphism of the Internal Transcribed Spacer of rDNA in *Camellia*——an Escape from Concerted Evolution

Ying Xu¹, Jing Xu^{1,3}, Jiyin Gao^{2,4}, Wenju Zhang^{1*}

¹Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Ministry of Education, Institute of Biodiversity Science, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; ²Guangdong Palm Landscape Architecture Research Institute, Zhongshan 528416, China; ³Shanghai Information Center for Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ⁴Subtropical Forestry Research Institute, Chinese Academy of Forestry Sciences, Fuyang 311400, China

Abstract In this study, we used 3 pairs of simple sequence repeat (SSR) markers from the 45S rDNA internal transcribed spacer (ITS) for PCR amplification in 40 species of *Camellia* to detect polymorphism in *Camellia* and the relationship between ploidy and polymorphism of species. In total, 37 species (92.5%) exhibited length polymorphism within individuals. At least 2–6 types of the ITS copies were found in individuals of these species, which indicates that non-concerted evolution is common in the ITS fragments in *Camellia*. Extensive non-concerted evolution may have resulted from SSR loci, which slip easily in the ITS region, and multiple rDNA loci that are located on different chromosomes. However, we did not find a significant difference in polymorphism between polyploidy and diploid. The polymorphism of the ITS region in *Camellia* species shows that there may be a more complex model of evolution in the rDNA of the genus, so the ITS sequences should be used with caution in solving the systematics problems of the genus.

Key words *Camellia*, concerted evolution, polymorphism, rDNA ITS

Xu Y, Xu J, Gao JY, Zhang WJ (2011). Polymorphism of the internal transcribed spacer of rDNA in *Camellia*——an escape from concerted evolution. *Chin Bull Bot* **46**, 162–169.

* Author for correspondence. E-mail: wjzhang@fudan.edu.cn