

文章编号:1001-1498(2015)01-0116-06

# 基于 AFLP 分子标记和 DNA 条形码对 无籽刺梨的鉴定

李 旦<sup>1,3</sup>, 周安佩<sup>1</sup>, 张德国<sup>1</sup>, 高 健<sup>2</sup>, 何承忠<sup>1</sup>, 李永和<sup>1,3\*</sup>

(1. 西南林业大学, 云南 昆明 650224; 2. 贵州兴仁县石漠化综合治理领导小组办公室, 贵州 兴仁 562300;  
3. 云南生物多样性研究院, 云南 昆明 650224)

**摘要:**利用 AFLP 分子标记和 DNA 条形码技术,对采自贵州省兴仁县和贵州省安顺市的刺梨、无籽刺梨和光枝无籽刺梨共 19 份样本材料进行鉴定。结果表明:AFLP 标记分析 19 个样本间的遗传相似系数在 0.719 0~0.997 2 之间,平均相似系数为 0.936 5。采用 UPGMA 法进行聚类分析,将 19 个样本聚类为 2 组,刺梨为单独 1 组,其他 18 份样本为 1 组。DNA 条形码分析结果显示 ITS 无变异位点,将 4 种叶绿体序列片段 (psbA-trnH、atpF-atpH、psbI-psbK、trnL-F) 合并后以联合序列作为数据分析的基础,19 份样本的平均误差为 0.000 6,除刺梨外,其他 18 份样本之间的遗传距离均为 0,而刺梨与无籽刺梨、光枝无籽刺梨之间的遗传距离均为 0.005 8。两种方法的鉴定结果一致,无籽刺梨与刺梨是独立的 2 个种,兴仁县无籽刺梨与安顺市的光枝无籽刺梨为同一个种。本研究结果明确了无籽刺梨的系统地位,从分子水平和基因水平上解决无籽刺梨的分类分歧,为今后开展无籽刺梨种质资源的收集、保存、开发和应用等奠定了理论基础。

**关键词:**刺梨;无籽刺梨;AFLP 分子标记;ITS 序列;cpDNA 序列

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

## Identification of *Rosa sterilis* Based on AFLP Molecular Markers and DNA Barcodes

LI Dan<sup>1,3</sup>, ZHOU An-pei<sup>1</sup>, ZHANG De-guo<sup>1</sup>, GAO Jian<sup>2</sup>, HE Cheng-zhong<sup>1</sup>, LI Yong-he<sup>1,3</sup>

(1. Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Rocky Desertification Comprehensive Treatment Office of Xing'ren County, Xing'ren 562300, Guizhou, China; 3. Yunnan Academy of Biodiversity, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** Nineteen *Rosa roxbunghii*, *R. sterilis* and *R. sterilis* var. *leioclada* specimen collected from Xing'ren and Anshun in Guizhou of China were identified by AFLP molecular markers and DNA barcodes. The results of AFLP showed that genetic similarity coefficient among the 19 specimen ranged from 0.719 0~0.997 2 and the average was 0.936 5. The result of UPGMA cluster analysis showed that the 19 specimen could be divided into two groups. *R. roxbunghii* was distinct from the others and formed one group separately, which the others fall into another group. The result of DNA barcodes showed that there was not variable site in ITS sequences and 4 cpDNA sequences showed highly closed affinity. Based on combined sequences, the average error was 0.000 6, while the genetic distance between *R. roxbunghii* and the others was 0.005 8. The identification results of two methods were consistent. *R. sterilis* and *R. roxbunghii* were two segregated species. The *R. sterilis* collected from Xing'ren and *R. sterilis* var. *leioclada* collected from Anshun belong to the same species. The results of this study determined the phylogeny

收稿日期:2014-07-21

基金项目:国家自然科学基金项目(31360156)、云南省科技厅项目(2008PY021)、西南林业大学校级科研启动基金资助项目

作者简介:李 旦(1985—),女,吉林省四平市人,博士,助理研究员,主要研究方向:林木遗传育种。

\* 通讯作者:博士,教授,博士生导师,研究方向:生物多样性保护与利用。

status of *R. sterilis* at the level of molecular and gene and laid the theoretical foundation for further collection, preservation, exploitation and application of *R. sterilis* germplasm resources.

**Key words:** *Rosa roxbunghii*; *Rosa sterilis*; AFLP markers; ITS sequences; cpDNA sequences

无籽刺梨(*Rosa sterilis* S. D. Shi),为蔷薇科(Rosaceae)蔷薇属(*Rosa*)多年生落叶攀援性灌木,高4~6 m,在其膨大的子房中,有膨大的胚珠,随着果实的发育而逐渐萎缩枯死,最终形成无籽果实,故名无籽刺梨。无籽刺梨为贵州特有种,贵州农学院于1981年进行全省刺梨资源调查时,在贵州省兴仁县发现,1985年贵州省植物园的时圣德先生发表的蔷薇属植物新种<sup>[1]</sup>。与刺梨(*R. roxbunghii* Tratt)相比,无籽刺梨鲜果的口感更佳,香气更浓郁,是珍贵的营养保健果品,被誉为“新山珍”,其鲜果的Vc含量达1 133 mg·(100 g)<sup>-1</sup>,单宁含量较低,含糖量较高,可溶性固形物达18%,并含B、Zn、Mo、Cu、Fe等多种矿物营养元素,具有较高的经济价值和广阔的开发应用前景<sup>[2-3]</sup>。此外,无籽刺梨凭借生长快、根系发达的特点,已作为山地造林与退耕还林等工程造林的优选树种之一<sup>[4]</sup>。

目前关于无籽刺梨的分类地位存在较大分歧。1998年,季祥彪和李淑久对贵州4种刺梨进行比较形态解剖学研究,认为无籽刺梨可能是贵州缙丝花(*R. kweichowensis* T. T. Yu & T. C. Ku)的自然杂交种<sup>[5]</sup>。2003年,文晓鹏等对刺梨及部分近缘种进行形态学性状和RAPD标记分析研究,推测无籽刺梨可能来源于贵州缙丝花的高度雄性不育变异<sup>[6]</sup>。2008年,安明态等发现无籽刺梨的一个变种——光枝无籽刺梨,又称安顺金刺梨,命名为*R. sterilis* S. D. Shi var. *leioclada* M. T. An, Y. Z. Cheng et M. Zhong。报道称,光枝无籽刺梨与近几十年来颇受国内外关注并誉称“维C之王”的刺梨近缘<sup>[7]</sup>。次年,邓朝义等按植物系统分类学命名法对无籽刺梨的命名进行了修订,将光枝无籽刺梨归为无籽刺梨<sup>[3]</sup>。

基于基因组DNA水平的分子标记技术,由于不受年龄、取样部位以及生长环境条件等因素影响,已广泛应用于种质资源的评价与鉴定研究。其中,AFLP是由RFLP和RAPD相结合的分子标记技术,它不仅具有RFLP的专一性和可靠性,而且具有RAPD的随机性和方便性<sup>[8]</sup>。2002年,Tautz等在《Nature》上发表论文,提出可以将DNA序列用于生物的分类<sup>[9]</sup>。次年,Hebert等首次正式提出了DNA条形码的概念,即DNA条形编码或称DNA条形码

技术(DNA barcoding)是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段(DNA barcode)自身在物种种内的特异性和种间的多样性而创建的一种新的生物身份识别系统,它可以对物种进行快速的自动鉴定<sup>[10-13]</sup>。为此,本研究应用AFLP分子标记和DNA条形码技术对刺梨、无籽刺梨和光枝无籽刺梨进行鉴别分析,从分子水平和基因水平上确定刺梨、无籽刺梨和光枝无籽刺梨的分类地位,为今后开展无籽刺梨种质资源的收集、保存、开发和应用等奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验样本共19份,于2013年8月、9月收集于贵州兴仁和安顺地区。将采集到的样本枝条进行扦插繁殖育苗,定植于西南林业大学树木园内。

试验样本CL-1,CL-2,CL-3,CL-4,CL-5采自于贵州省兴仁县回龙镇的无籽刺梨植株;CL-6,CL-7,CL-8,CL-9,CL-10采自于贵州省安顺市普定县的光枝无籽刺梨(金刺梨)植株,CL-11,CL-12,CL-13,CL-14,CL-15采自于贵州省安顺市西秀区的光枝无籽刺梨(金刺梨)植株;CL-16采自于贵州省兴仁县巴铃镇的刺梨植株;CL-17,CL-18,CL-19采自于贵州省兴仁县回龙镇的无籽刺梨压条繁殖植株。

### 1.2 DNA的提取

分别采取供试材料19个样本的幼嫩叶片带回西南林业大学林木遗传育种实验室,采用植物DNA提取试剂盒提取DNA,用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量,用紫外分光光度计(Spek1-1300)检测其浓度,最后分取各样本50 μL DNA样品稀释至20 mg·L<sup>-1</sup>,保存于-20℃冰箱中备用。

### 1.3 AFLP分子标记分析

AFLP分析的基本程序按照Vos等<sup>[14]</sup>所描述的方法进行,并依据本实验室的前期经验对体系进行优化。采用*EcoR* I/*Pst* I酶切组合进行基因组限制性双酶切,预扩增反应选用引物组合E00/P00,选择性扩增反应采用引物组合E+2/P+3和E+3/P+3。PCR扩增反应在PTC-100TM Thermal PCR仪上进行。选择性扩增产物经95℃ 5 min变性后,在

6%的变性聚丙烯酰胺序列分析胶上电泳分离。应用 JY-CX2B 型(改进型)测序电泳槽,在 90 W 恒定功率条件下电泳约 90 min。电泳后采用银染检测法进行 AFLP 指纹显色反应<sup>[15]</sup>。试验结果按照电泳图谱中同一位置上 AFLP 条带的有无进行统计,有带记为“1”,无带记为“0”,形成 0/1 矩阵图输入计算机。利用 DCFA 1.1 软件将 AFLP 谱带统计结果转换为 POPGENE 软件<sup>[16]</sup>适用文件,应用 POPGENE 1.31 软件<sup>[17]</sup>对全部样本进行遗传参数分析,计算多态位点百分率等参数,采用 UPGMA 方法对样本进行聚类分析。

#### 1.4 DNA 条形码技术

PCR 扩增反应总体系为 25  $\mu$ L,其中正反引物各 1  $\mu$ L(引物浓度为 5 pmol),引物序列及来源见表 1,DNA 模板 1  $\mu$ L,2  $\times$  Taq MasterMix 12.5  $\mu$ L,去离子水 9.5  $\mu$ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C (psbA-trnH、atpF-atpH、psbI-psbK、ITS)/59 $^{\circ}$ C (trnL-F 序列)退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。扩增产物送往北京华大基因科技股份有限公司进行测序。

结果采用 Bioedit 7.0 进行序列的拼接与人工校对,以确保准确性,使用 Clustal X 1.8 进行多序列的比对切齐<sup>[18]</sup>。用 PAUP 4.0 软件对 4 种引物序列进行非一致性长度检验(ILD 检验)<sup>[19]</sup>。利用 MEGA 5.02 软件分析序列长度、碱基组成等序列特征,通过 Kimura 2-parameter(K2P)模型计算遗传距离<sup>[20-21]</sup>。

表 1 扩增引物及来源

名称	方向	引物	文献
pabA-trnH	pasA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Lahaye <sup>[22]</sup>
	trnH	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	
atpF- atpH	atpF	ACTCGCACACACTCCCTTTCC	Lahaye <sup>[23]</sup>
	atpH	GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT	
psbI-psbK	psb-I	AGAGTTTGAGAGTAAGCAT	Lahaye <sup>[23]</sup>
	psb-K	TTAGCCTTTGTTTGCCAAG	
trnL-F	trnL	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet <sup>[24]</sup>
	trnF	CGAAATCGGTAGACGCTACG	
ITS	ITS1	TCCGTAGTGAACTGCCG	White <sup>[25]</sup>
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

## 2 结果与分析

### 2.1 AFLP 标记分析

通常情况下,AFLP 每一条扩增带都对应着一个 DNA 分子位点,出现多态性扩增带,说明样本间在该位点上存在差异。本实验应用 *Eco*R I 和 *Pst* I 内切酶进行酶切,从 120 对引物组合中筛选出 12 对

AFLP 引物组合,对 19 份样本的 DNA 样品进行 PCR 扩增。通过 12 对 AFLP 引物组合对 19 个样本进行了分析,共检测到 367 个标记,其中多态性标记 116 个,多态带百分率为 30.93%。平均每对引物扩增出 30.58 条带,平均多态性带为 9.67 条。其中 E + GA/P + ATG 是最有效率的一对引物,其产生位点的多态性条带比率达到 56.25%,而引物 E + GT/P + CAA 扩增出的条带的多态性比率最低,其多态性条带比率为 5.88%(表 2)。

表 2 19 份样本 12 对不同引物组合的条带多态性

引物组合	总条带数	多态性条带数	多态性百分率/%
E + GT/P + CAA	34	2	5.88
E + CAC/P + CTT	32	10	31.25
E + GT/P + ATG	34	6	17.65
E + AC/P + CAA	41	15	36.59
E + GA/P + ATG	32	18	56.25
E + AAA/P + ATG	38	13	34.21
E + AAC/P + ATG	23	8	34.78
E + AAC/P + TGC	29	9	31.03
E + ATC/P + CAA	23	4	17.39
E + CAC/P + CAA	30	8	26.67
E + CAG/P + CGC	15	4	26.67
E + GAA/P + AAC	36	19	52.78
总计	367	116	—
平均	30.58	9.67	30.93

POPGENE 分析结果显示,19 个样本间的遗传相似系数在 0.719 0 ~ 0.997 2 之间,平均相似系数为 0.936 5(表 3)。采用 UPGMA 法进行聚类得到系统关系树,将 19 个样本聚类为 2 组(图 1)。第 I 组为 CL-16 即刺梨,第 II 组为其他 18 份样本即包括 5 份贵州省兴仁县回龙镇的无籽刺梨,5 份贵州省安顺市普定县的光枝无籽刺梨,5 份安顺市西秀区的光枝无籽刺梨和 3 份兴仁县回龙镇的无籽刺梨压条繁殖植株的样本构成。这 18 份样本的遗传相似系数在 0.93 以上。

### 2.2 DNA 条形码分析

将序列进行比对切齐后,用 PAUP4.0 软件对 4 种引物序列进行非一致性长度检验(ILD 检验),其结果表明 4 种叶绿体序列片段(psbA-trnH、atpF-atpH、psbI-psbK、trnL-F)的吻合度高( $P = 1 > 0.05$ ),可将序列进行合并,并以联合序列作为数据分析的基础(表 4)。由于 ITS 无变异位点,故只对叶绿体的联合序列片段进行 K2P 模型的遗传距离分析。结果显示,19 份样本的平均误差为 0.000 6,除 CL-16 即刺梨外,其他 18 份样本之间的遗传距离均为 0,而 CL-16 与他们的遗传距离均为 0.005 8(表 5)。由于序列无信息位点,故不用进行系统发育树的构建。

表 3 19 份样本的遗传相似系数

CL-1	CL-2	CL-3	CL-4	CL-5	CL-6	CL-7	CL-8	CL-9	CL-10	CL-11	CL-12	CL-13	CL-14	CL-15	CL-16	CL-17	CL-18	CL-19	
CL-1																			
CL-2	0.997 2																		
CL-3	0.994 5	0.997 2																	
CL-4	0.944 9	0.947 7	0.950 4																
CL-5	0.978 0	0.975 2	0.978 0	0.961 4															
CL-6	0.980 7	0.983 5	0.980 7	0.958 7	0.986 2														
CL-7	0.969 7	0.972 5	0.969 7	0.964 2	0.980 7	0.989 0													
CL-8	0.978 0	0.980 7	0.978 0	0.955 9	0.972 5	0.980 7	0.980 7												
CL-9	0.983 5	0.980 7	0.983 5	0.950 4	0.983 5	0.980 7	0.969 7	0.989 0											
CL-10	0.966 9	0.969 7	0.972 5	0.961 4	0.978 0	0.980 7	0.980 7	0.989 0	0.983 5										
CL-11	0.953 2	0.955 9	0.953 2	0.953 2	0.964 2	0.972 5	0.978 0	0.975 2	0.964 2	0.980 7									
CL-12	0.964 2	0.966 9	0.964 2	0.953 2	0.980 7	0.983 5	0.983 5	0.975 2	0.969 7	0.980 7	0.983 5								
CL-13	0.966 9	0.964 2	0.961 4	0.950 4	0.983 5	0.980 7	0.980 7	0.972 5	0.972 5	0.978 0	0.980 7	0.997 2							
CL-14	0.958 7	0.961 4	0.958 7	0.947 7	0.969 7	0.972 5	0.978 0	0.969 7	0.958 7	0.975 2	0.978 0	0.989 0	0.986 2						
CL-15	0.955 9	0.958 7	0.955 9	0.939 4	0.955 9	0.958 7	0.964 2	0.961 4	0.950 4	0.966 9	0.969 7	0.969 7	0.966 9	0.980 7					
CL-16	0.730 0	0.732 8	0.730 0	0.719 0	0.730 0	0.738 3	0.743 8	0.730 0	0.719 0	0.735 5	0.743 8	0.743 8	0.741 0	0.754 8	0.768 6				
CL-17	0.933 9	0.931 1	0.928 4	0.900 8	0.933 9	0.931 1	0.925 6	0.917 4	0.922 9	0.922 9	0.925 6	0.931 1	0.933 9	0.936 6	0.955 9	0.774 1			
CL-18	0.933 9	0.931 1	0.928 4	0.906 3	0.939 4	0.936 6	0.931 1	0.922 9	0.928 4	0.928 4	0.931 1	0.936 6	0.939 4	0.931 1	0.950 4	0.768 6	0.994 5		
CL-19	0.928 4	0.925 6	0.922 9	0.900 8	0.933 9	0.931 1	0.925 6	0.917 4	0.922 9	0.922 9	0.925 6	0.931 1	0.933 9	0.925 6	0.944 9	0.774 1	0.989 0	0.994 5	

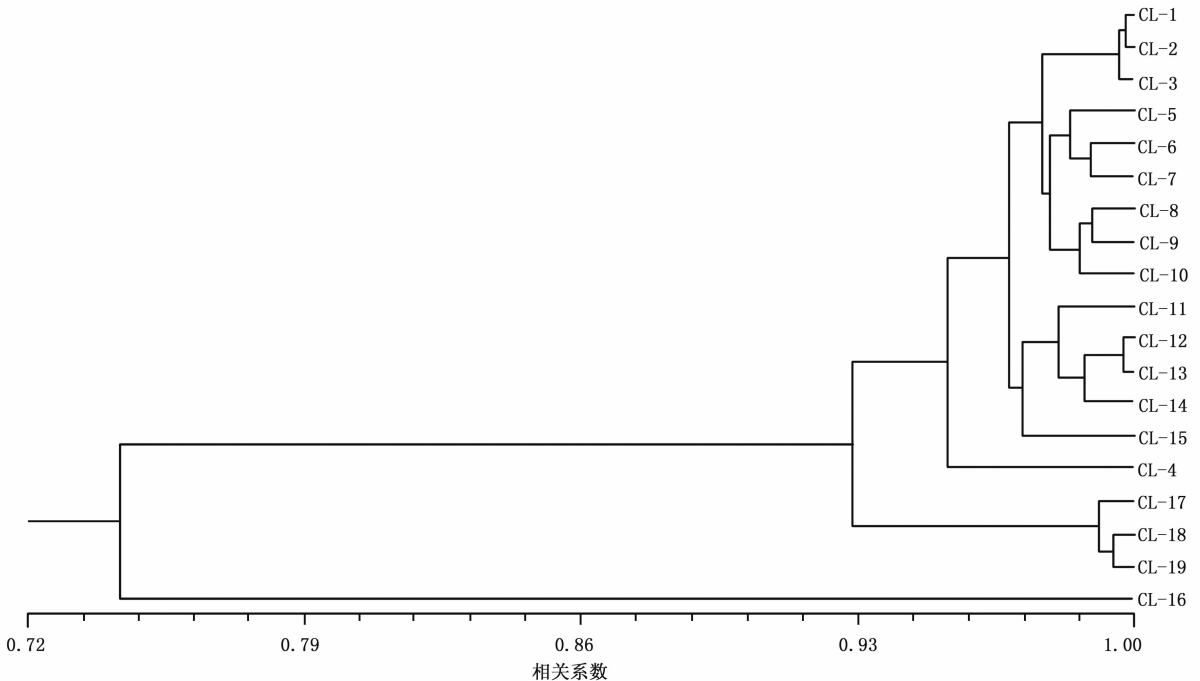


图 1 19 份样本 12 对引物 AFLP 标记的聚类分析

表 4 叶绿体基因片段的序列特征

cpDNA	长度范围/bp	平均长度/bp	对齐后长度/bp	C + G/%	保守位点	变异位点	信息位点
psbA-trnH	348 - 357	348.5	362	25.3	347	1	-
atpF-atpH	665 - 371	670.7	683	30.3	666	5	-
psbI-psbK	256 - 258	257.9	258	32.2	256	2	-
trnL-F	995 - 997	995.1	997	31.8	990	5	-
cpDNA 联合序列	2 272 - 2 275	2 272.2	2 300	30.4	2 259	13	-
ITS	664 - 675	664.6	675	56.6	664	-	-

### 3 结论与讨论

AFLP 标记所揭示的是分析样本基因组 DNA 在

酶切位点和其后的选择性碱基的变异,多态性条带的数量反映了供试材料之间在 DNA 水平上酶切位点的差异性<sup>[26]</sup>。赵琴等利用 AFLP 分子标记技术,

表 5 19 份样本 cpDNA 片段 K2P 模式的遗传距离

	CL-1	CL-2	CL-3	CL-4	CL-5	CL-6	CL-7	CL-8	CL-9	CL-10	CL-11	CL-12	CL-13	CL-14	CL-15	CL-16	CL-17	CL-18
CL-1		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-2	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-3	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-4	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-6	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-7	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-8	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-10	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-11	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-12	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-13	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-14	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.000 0	0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-15	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0		0.001 6	0.000 0	0.000 0
CL-16	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.005 8	0.001 6	0.001 6
CL-17	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.005 8		0.000 0
CL-18	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.005 8	0.000 0	
CL-19	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.005 8	0.000 0	0.000 0

注:下三角为遗传距离,上三角为标准误。

对 9 份常用狗牙根材料的遗传多样性进行了分析<sup>[27]</sup>。鲁凤娟应用 AFLP 分子标记鉴定库尔勒香梨的分类地位,确定库尔勒香梨与白梨系统、沙梨系统、秋子梨系统、西洋梨系统的亲缘关系<sup>[28]</sup>。本研究应用中 AFLP 分子标记技术,对 19 份样本之间的遗传差异分析显示,多态带百分率为 30.93%,说明供试样本之间在 DNA 水平上具有较低的遗传变异,这与无籽刺梨长期依靠无性繁殖扩繁相一致。POP-GENE 软件分析显示,19 个样本的平均遗传相似系数为 0.936 5。UPGMA 法进行聚类分析明显地将刺梨和其他 18 份无籽刺梨样本分成 2 组,且 18 份样本的遗传相似系数在 0.93 以上。

目前,DNA 条形码技术已被广泛应用于物种的鉴别研究。唐先华等测定和分析了 5 个属的 7 种睡莲类植物核糖体 ITS 序列,并与 GenBank 中提取的相关序列进行了组合分析,初步获得了睡莲类植物的 2 个 ITS 系统树<sup>[29]</sup>。王晓锋等对黄杨属 18 种植物的 ITS 序列比较发现,珍珠黄杨并非瓜子黄杨的变种,而是属于姊妹种,并且发现珍珠黄杨与大花黄杨的亲缘关系相对较近<sup>[30]</sup>。Lahaye 等比较了中美洲、北美洲 2 个生物多样性密集区域 1 600 个植物样本的 8 种 DNA 条形码候选片段,发现 matK 在单个片段中的识别率最高,建议将其作为开花植物的通用 DNA 条形码<sup>[31]</sup>。Yang 等利用 ITS、matK、rbcL、trnH-psbA 共 4 种候选 DNA 条形码片段对中国省藤属 15 个种及变种进行了鉴定分析,结果表明,trnH-psbA 序列片段拥有较高的变异信息,物种识别率为 56.3%,若把南巴省藤的变种和云南省藤归为一个

种,其识别率则达到 91.7%<sup>[32]</sup>。由此可见,植物基因组的复杂性使得同一个 DNA 条形码候选序列对不同物种的鉴定效果具有较大差异。因此,在对植物条形码的研究中,除了对单片段的评估外,很多研究者相继提出了不同的片段组合方案<sup>[33]</sup>。Liu 等对欧亚地区红豆杉的 5 种 DNA 条形码及其片段组合进行了比较,发现 trnL-F 和 ITS 无论单片段还是其片段组合均能很好地对红豆杉属植物进行识别<sup>[34]</sup>。Zhang 等利用 trnS-trnG 和 ndhF 片段对茄属 48 个种 70 份个体进行鉴定,成功识别率达 100%<sup>[35]</sup>。本研究 DNA 条形码分析结果显示 ITS 无变异位点。将 4 种叶绿体序列片段 (psbA-trnH、atpF-atpH、psbI-psbK、trnL-F) 进行合并后以联合序列作为数据分析,19 份样本中除刺梨外,其他 18 份样本之间的遗传距离均为 0,而刺梨与他们的遗传距离均为 0.005 8。

本研究基于 AFLP 分子标记和 DNA 条形码对无籽刺梨的鉴定结果一致,无籽刺梨与刺梨是独立的 2 个种,兴仁县无籽刺梨、安顺市光枝无籽刺梨为同一个种。研究结果与邓朝义等从形态学上对贵州特有种子植物无籽刺梨的分类学订正结果一致,将光枝无籽刺梨与无籽刺梨归并为一类<sup>[3]</sup>。文晓鹏等对刺梨及部分近缘种进行形态学性状和 RAPD 标记分析研究,也表明刺梨与无籽刺梨是独立的 2 种,非近缘种<sup>[6]</sup>。本研究应用分子标记和 DNA 条形码技术对无籽刺梨相似种进行鉴定,从分子水平和基因水平上订正了 2008 年安明态等<sup>[7]</sup>关于光枝无籽刺梨是一个区别于无籽刺梨的新种论述,且提出了该种与刺梨并非近缘种的证明,遗传相似系数仅为

0.73。研究结果明确了无籽刺梨的系统地位,从分子水平和基因水平上解决无籽刺梨的分类分歧,为今后开展无籽刺梨种质资源的收集、保存、开发和应用等提供了科学理论依据。

### 参考文献:

- [1] 时圣德. 贵州蔷薇属植物新分类群[J]. 贵州科学, 1985, 9(1): 8-9.
- [2] 付慧晓, 王道平, 黄丽荣, 等. 刺梨和无籽刺梨挥发性香气成分分析[J]. 精细化工, 2012, 29(9): 875-878.
- [3] 邓朝义, 方仕能, 黄 勇. 贵州特有种子植物无籽刺梨形态特征研究及分类学订正[J]. 种子, 2009, 28(9): 62-68.
- [4] 韦景枫, 钟 漫, 程友忠, 等. 无籽刺梨试管苗移栽及其影响因素的探讨[J]. 中国林副特产, 2010, 104(6): 30-31.
- [5] 季祥彪, 李淑久. 贵州4种刺梨的比较形态解剖学研究[J]. 山地农业生物学报, 1998, 1(1): 28-33.
- [6] 文晓鹏, 庞晓明, 邓秀新. 刺梨及部分近缘种的形态学形状及 RAPD 标记分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 204-206.
- [7] 安明态, 程友忠, 钟 漫, 等. 贵州蔷薇属一新变种——光枝无籽刺梨[J]. 种子, 2009, 28(1): 6.
- [8] 纵 丹, 员 涛, 周安佩, 等. 滇杨优树遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(4): 103-108.
- [9] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. Nature, 2002, 418: 479.
- [10] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2003, 270: 313-321.
- [11] Liu J, Shi L, Han J, et al. Identification of species in the angiosperm family Apiaceae using DNA barcodes[J]. Molecular Ecology Resources, 2014 Apr 16. doi: 10.1111/1755-0998.12262.
- [12] Weitschek E, Fison G, Felici G. Supervised DNA barcodes species classification: analysis, comparisons and results[J]. BioData Mining, 2014 Apr 11, 7(1):4. doi: 10.1186/1756-0381-7-4.
- [13] Li X, Yang Y, Henry R J, et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome[J]. Biological Reviews, 2014 Mar 26, doi: 10.1111/brv.12104.
- [14] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic acids research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [15] Tixier M H, Sourdille P, Röder M, et al. Detection of wheat microsatellites using a non radioactive silver-nitrate staining method[J]. Journal of Genetics and Breeding, 1997, 51(2): 175-178.
- [16] 张富民, 葛 颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD 数据的 AMOVA 分析[J]. 生物多样性, 2002, 10(4): 438-444.
- [17] Yeh F, Yang R C, Boyle T. POPGENE. A User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis [M]. Edmonton: Molecular and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997.
- [18] 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 research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [19] Swofford D L. PAUP \* 4.0: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Beta version 4.0 b10[M]. Sunderland: Sinauer Associates. 2002.
- [20] Kimura M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981, 78(1): 454-458.
- [21] Kumar S, Tamura K, Nei M, et al. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.02[J]. Systematic Biology, 1995, 44(4): 576-577.
- [22] Lahaye R, Bank M V D, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [23] Lahaye R, Savolainen V, Duthoit S, et al. A test of psbK-psbI and atpF-atpH as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (South Africa)[J]. Nature Precedings, 2008: 1-21.
- [24] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(5): 1105-1109.
- [25] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A eds., PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. New York: Academic Press, 1990, 315-322.
- [26] 黄建安, 李家贤, 黄意欢, 等. 茶树品种资源遗传多样性的 AFLP 研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 317-322.
- [27] 赵 琴, 刘 君, 杨志民. AFLP 分子标记对 9 份狗牙根材料的鉴定分析[J]. 草地学报, 2012, 20(6): 1156-1162.
- [28] 鲁凤娟. 利用 AFLP 分子标记鉴定库尔勒香梨的分类地位[J]. 江苏农业科学, 2010(3): 40-41.
- [29] 唐先华, 张晓艳. 睡莲类植物 ITS nrDNA 序列的分子系统发育分析[J]. 地球科学: 中国地质大学学报, 2003, 28(1): 97-101.
- [30] 王晓锋, 刘娜娜, 季孔庶. 黄杨属植物 ITS 序列分子进化特点分析[J]. 分子植物育种, 2011, 9(4): 506-513.
- [31] Lahaye R, Van der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(8): 2923-2928.
- [32] Yang H Q, Dong Y R, Gu Z J, et al. A Preliminary Assessment of mat K, rbc L and trn H-psb A as DNA Barcodes for *Calamus* (Arecaceae) Species in China with a Note on ITS [C]//Annales Botanici Fennici. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board, 2012, 49(5): 319-330.
- [33] 宁淑萍, 颜海飞, 郝 刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展[J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417-425.
- [34] Liu J I E, Moeller M, GAO L M, et al. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus L.*, Taxaceae) and the discovery of cryptic species[J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11(1): 89-100.
- [35] Zhang W, Fan X H, Zhu S F, et al. Species-specific identification from incomplete sampling: applying DNA barcodes to monitoring invasive *solanum* plants[J]. PloS One, 2013, 8(2): e55927.