

研究报告

A Letter

基于 ITS 和 cpDNA 序列的中国野生葡萄分子系统进化

张永辉[✉], 樊秀彩[✉], 张颖[✉], 孙海生[✉], 姜建福[✉], 刘崇怀[✉]

中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州, 450009

✉ 通讯作者: iuchonghuai@caas.net.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 78 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0078

收稿日期: 2011 年 05 月 16 日

接受日期: 2011 年 06 月 13 日

发表日期: 2011 年 06 月 22 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

张永辉等, 2011, 基于 ITS 和 cpDNA 序列的中国野生葡萄分子系统进化, 分子植物育种 Vol.9 No.78 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0078)

摘要 我国是葡萄属植物的主要起源地之一, 也是世界葡萄属植物种类最多, 遗传资源最为丰富的国家之一。迄今为止, 已知起源于我国的葡萄属植物共有 38 个种 1 个亚种和 7 个变种。如此丰富多彩的葡萄属种质资源不仅对葡萄科学的发展有重大意义, 也是阐明世界葡萄起源、演化和生物多样性必不可少的重要证据。利用核糖体转录间隔区(ITS)和 3 个叶绿体 DNA (cpDNA)序列(*atpF-atpH*, *trnH-psbA* 和 *trnL-trnF*)对 16 个中国葡萄野生种、变种及其近缘植物的 22 份材料的亲缘关系和分子系统进化进行研究。以圆叶葡萄为外类群, 首次利用 ITS 和 cpDNA 序列构建了中国野生葡萄的分子系统发育树。叶绿体 DNA 序列构建的系统发育树显示, 22 份材料之间的亲缘关系与其在不同大陆间的地理分布一致; ITS 构建的系统发育树显示, 22 份材料的 30 个克隆可分成 2 个主要分枝, 其中分枝 E 又可分为 4 个亚分枝, 由于多重核糖体 DNA 序列等因素影响, ITS 树存在塌陷, ITS 系统进化树结果较为复杂, 仅能部分揭示 22 份材料之间的亲缘关系; 综合分析 cpDNA 序列和 ITS 序列的聚类结果, 初步推断‘燕山葡萄 0947’为母本为中国野生葡萄的一个种, 父本为河岸葡萄的种间杂种; 初步推断桑叶葡萄为一个独立的中国葡萄野生种。

关键词 中国野生葡萄; 核糖体转录间隔区; 叶绿体 DNA 序列; 亲缘关系

A Molecular Phylogenetic Study of Chinese Wild Vitis (Vitaceae) Based on Internal Transcribed Spacer and Chloroplast DNA Sequence

Zhang Yonghui[✉], Fan Xiucui[✉], Zhang Ying[✉], Sun Haisheng[✉], Jiang Jianfu[✉], Liu Chonghuai[✉]

Zhengzhou Fruit Research Institute, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, 450009, P.R. China

✉ Corresponding author, liuchonghuai@caas.net.cn; ✉ Authors

Abstract As one of the major original centers of *Vitis* species, China has abundant genetic resources in the world. So far, 38 species, 1 subspecies and 7 varieties of Chinese wild grapes were originated in China. The *vitis* germplasm resources were not only significant in the development of grape science, but also provided an indispensable evidence to clarify the origin, evolution and biodiversity of the *Vitis* in the world. The genetic relationship of 22 *vitis* materials of 16 Chinese wild grape species and their relatives were determined based on sequence analysis of nuclear internal transcribed spacer(ITS) and 3 chloroplast DNA (cpDNA) sequences (*atpF-atpH*, *trnH-psbA* and *trnL-trnF*). Molecular phylogenetic trees were constructed based on cpDNA and ITS sequences with the *Vitis rotundifolia* as the outgroup. Based on the combined analysis of 3 chloroplastid DNA sequences, *Vitis* was split into three clades that mirror the continental distribution of these accessions. Phylogenetic tree which was constructed by ITS sequence showed that two main clades and four subclades were generated from the 22 *vitis* materials. Due to the influence of Multiple rDNA arrays and other facts, the phylogenetic of the ITS was relatively complex, and only demonstrated the relationships of 22 *vitis* materials partially. From the clustering results of cpDNA sequences and ITS sequences, we preliminarily determined ‘Yanshanputao 0947’ was an interspecific hybrid, which female and male parent were one species of the Chinese wild grapes and *V. riparia* Michx., respectively. *V. heyneana* Roem. & Schult subsp. *ficifolia* (Bge.) C.L.Li. could be a separate species from this result.

Keywords Chinese wild grape; ITS; Chloroplast DNA sequences; Genetic relationship

研究背景

我国是世界葡萄属(*Vitis* L.)植物种质资源最丰

富的国家, 原产的葡萄属植物有 38 个种、1 亚种和 7 个变种, 尚不确定或有争议的疑问种或变种有 14

个(孔庆山, 2004)。在过去的几十年里从形态学(李朝奎等, 1996)、孢粉学(刘三军等, 1997)、解剖学(何永华等, 1994)、生物化学(马之胜和贺普超, 1998)和分子标记技术(张立平等, 1998)等方面对中国野生葡萄的分类和亲缘关系进行了大量的研究。由于葡萄属内种间性状的过渡类型和种内多型性现象比较常见, 加之分类学者对种或变种等的分类标准意见不一, 使得我国原生的葡萄属植物种类的具体数目尚无公认的定论(孔庆山, 2004)。

近期, DNA 序列分析被用于葡萄属植物的系统进化研究(Tröndle et al., 2010), 由于 DNA 序列分析具有如下优点: (1)测定相对较快, 能够获得大量性状; (2)序列之间的可比性强, 可通过 GeneBank 等获取相关序列, 对不同的序列进行比较; (3)DNA 序列分析的软件和方法的不断创新和完善。目前, 植物的 cpDNA 序列和核糖体 IT 序列在植物类群的系统发育研究中应用较多(汪小全等, 1997)。

叶绿体中的非编码区包括内含子(rpl16, rps16, rpoC1 等)和转录间隔区(*atpF-atpH*, *trnH-psbA*, *trnL-trnF*等), 由于其在功能上受到限制较少, 进化速率较快, 适用于较低分类阶元及其分化类群间的系统学研究(Shaw et al., 2005), 已在甘草属、芍药属等物种中用于属间和属内种间的系统进化研究(Kondo et al., 2007; 张金梅等, 2008, 中国科学C辑: 生命科学, 38(12): 1166-1176), 并在棱果沙棘中用于检测杂种材料的母系血统来确定其起源(Wang et al., 2008)。

ITS区是核糖体DNA中的转录间隔区, 以数以千万计的串联重复形式存在于一个或多个染色体基因位点上, 它位于18S rDNA、5.8S rDNA和26S rDNA之间, 包含被5.8S rDNA分隔开的ITS1和ITS2两个间隔序列。ITS在被子植物中为双亲遗传, 由

于其DNA序列长度保守、基因组内一致和基因组间可变等特点(A lvarez and Wendel, 2003), 已在乌头属、柑橘属等植物中用于系统进化研究来推断物种的起源和亲缘关系(Luo et al., 2005; Li et al., 2010)。

本研究利用3个叶绿体转录间隔区(*atpF-atpH*, *trnH-psbA*和*trnL-trnF*)和核糖体基因组的ITS序列对包括16个中国葡萄野生种及其近缘植物在内的22份材料构建系统进化树, 来确定中国葡萄野生种及其近缘植物间的亲缘关系, 为中国野生葡萄资源的遗传进化研究提供初步的理论依据。

1 结果与分析

1.1 cpDNA 序列分析

通过对中国野生葡萄及其近缘种 22 份材料的 cpDNA 片段(*atpF-atpH*, *trnH-psbA* 和 *trnL-trnF*)的测序分析可知, 3 个 cpDNA 序列中, *trnT-trnL* 简约信息位点最多(5.6%), *trnH-psbA* 简约信息位点最少(0.46%), GC 含量 27.9%~31.3%。对 3 个 cpDNA 序列进行合并分析, 合并后序列长度为 1938 bp, 其中变异位点为 113 个, 简约信息位点为 55 个(表 1)。

1.2 cpDNA 聚类分析

为分析中国野生葡萄及其近缘种的系统发生关系, 以圆叶葡萄亚属的代克赛(*V. rotundifolia* cv. Dixie)为外类群, 采用最大简约法构建严格一致性树(Strict consensus tree)。从(图 1)可以看出: 以圆叶葡萄亚属为外类群, 真葡萄亚属材料有 3 个主要分枝, 分枝 A 包括美洲种群的河岸葡萄和沙地葡萄, 分枝 B 包括欧亚种葡萄, 分枝 C 包括中国葡萄野生种, 且欧亚种与中国葡萄野生种的亲缘关系较近, 这些样本之间的亲缘关系与其在不同大陆间的地理分布一致。

表1 3个叶绿体转录间隔区序列片段的序列特征

Table 1 The cpDNA sequence characters of the three regions analyzed

DNA 片段	序列比对长度(bp)	变异位点数	信息位点	GC 含量(%)
DNA fragment	Aligened length (bp)	Variable site	Informative site	GC (%)
<i>AtpF-atpH</i>	614	17	3	31.3
<i>TrnH-psbA</i>	433	6	2	30.1
<i>TrnT-trnL</i>	891	90	50	27.9
Combined	1938	113	55	29.5

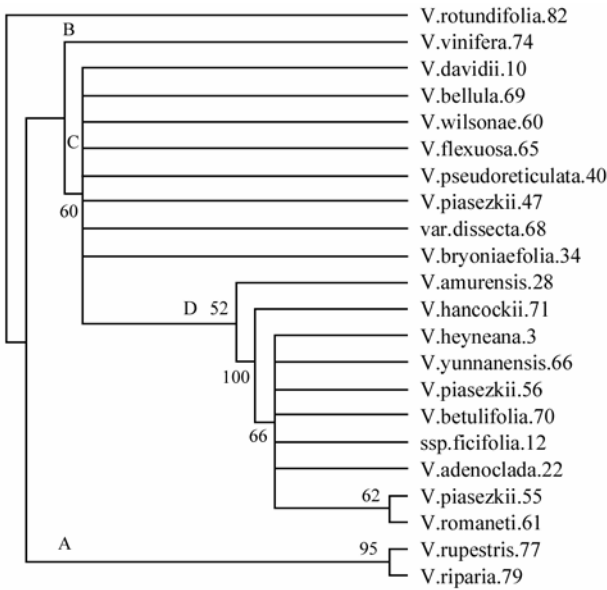


图1 由22个葡萄属植物基因型的3个叶绿体DNA片段组合 (*atpF-atpH*, *trnH-psbA*和*trnL-trnF*)构建的最大简约树
注: 树长=113, 一致性指数=0.9823, 保留指数=0.9950; 分支上的数字是1000次自展的数据支持率

Figure 1 Maximum parsimonious tree for 22 genotypes of *vitis* materials obtained from combined data set of three cpDNA fragments

Note: The tree has a length of 113 steps, a consistency index (CI) of 0.9823, a retention index(RI) of 0.9950; Numbers above the branches are bootstrap values (%) of 1000 replications

1.3 ITS 序列分析

对中国野生葡萄及其近缘种的 22 份材料的 66 个克隆的 ITS 序列进行序列分析, 结果表明, ‘灵宝变叶 01’、‘变叶葡萄 0958’、‘卢氏网脉 02’、‘燕山葡萄 0947’、‘菱叶葡萄 0945’、‘玫瑰香’、‘河岸葡萄 6402’和‘代克赛’中有两种不同类型的 ITS 序列, 故选择 30 个 ITS 序列进行系统学分析(表 2)。其中, 5.8S 序列的长度在 22 份材料中基本一致为 160bp, 仅在毛葡萄、腺枝葡萄和桑叶葡萄的 114 位存在一个碱基(T)的插入。‘*V. riparia.79.1*’、‘*V. riparia.79.3*’

和‘*var. dissecta.68.2*’在 ITS 序列的 497-509 处有连续 12 个碱基的删除, ‘*V. heyneana.3.2*’、‘*ssp. ficifolia.12.2*’和‘*V. adenoclada.22.2*’在 ITS 序列的 679-680 处有连续 11 个碱基的删除(图 2)。分析结果表明 ITS 序列多态性好, 能够用于葡萄属种间的系统分类学研究。

1.4 ITS 序列聚类分析

为分析中国野生葡萄及其近缘种的系统发生关系, 以圆叶葡萄亚属的 *Dixie* 为外类群, 采用最大简约法构建严格一致性树(Strict consensus tree)。从(图 3)可以看出, 以圆叶葡萄亚属材料为外类群, 真葡萄亚属植物为单系群(BS 100%), 真葡萄亚属材料有两个主要分枝, 分枝 E 包括 18 个种在内的 25 个克隆, 可分为 G、H、I 和 J 4 个亚分枝。分枝 F 包括形态特征较为相近的‘桑叶葡萄 943’、‘都安毛葡萄’和‘罗城腺枝 01’3 个种的 3 个克隆, ‘*V. heyneana.3.2*’和‘*V. adenoclada.22.2*’首先聚为一枝(BS 100%), 再与‘*ssp. ficifolia.12.2*’聚在一起(BS 100%)。

2 讨论

2.1 叶绿体转录间隔区 DNA 聚类分析

利用 3 个叶绿体转录间隔区 (*atpF-atpH*, *trnH-psbA* 和 *trnT-trnL*)对 22 份葡萄属植物进行系统发育重建, 以圆叶葡萄亚属为外类群, 真葡萄亚属材料有 3 个主要分枝, 分枝 A 包括美洲种群的河岸葡萄和沙地葡萄, 分枝 B 包括欧亚种葡萄, 分枝 C 包括中国葡萄野生种, 表明样本之间的亲缘关系与其大陆性地理分布相一致。Tröndle 等(2010)利用 3 个 cpDNA 序列(*trnL* intron, *trnL-F* IGS 和 *trnK* intron)对 30 个种的 47 份葡萄属植物材料进行葡萄属植物的起源和进化的研究也表明同一大陆起源的样本亲缘关系较近。

表2 ITS序列特征

Table 2 The characters of ITS sequence

DNA 片段	序列比对长度(bp)	变异位点数	信息位点数	GC 含量(%)
DNA fragment	Aligened length (bp)	Variable site	Informative site	GC (%)
ITS1	296	95	70	72.4
ITS2	231	73	52	74.0
5.8S	161	24	19	53.9
Combined	694	282	185	68.6

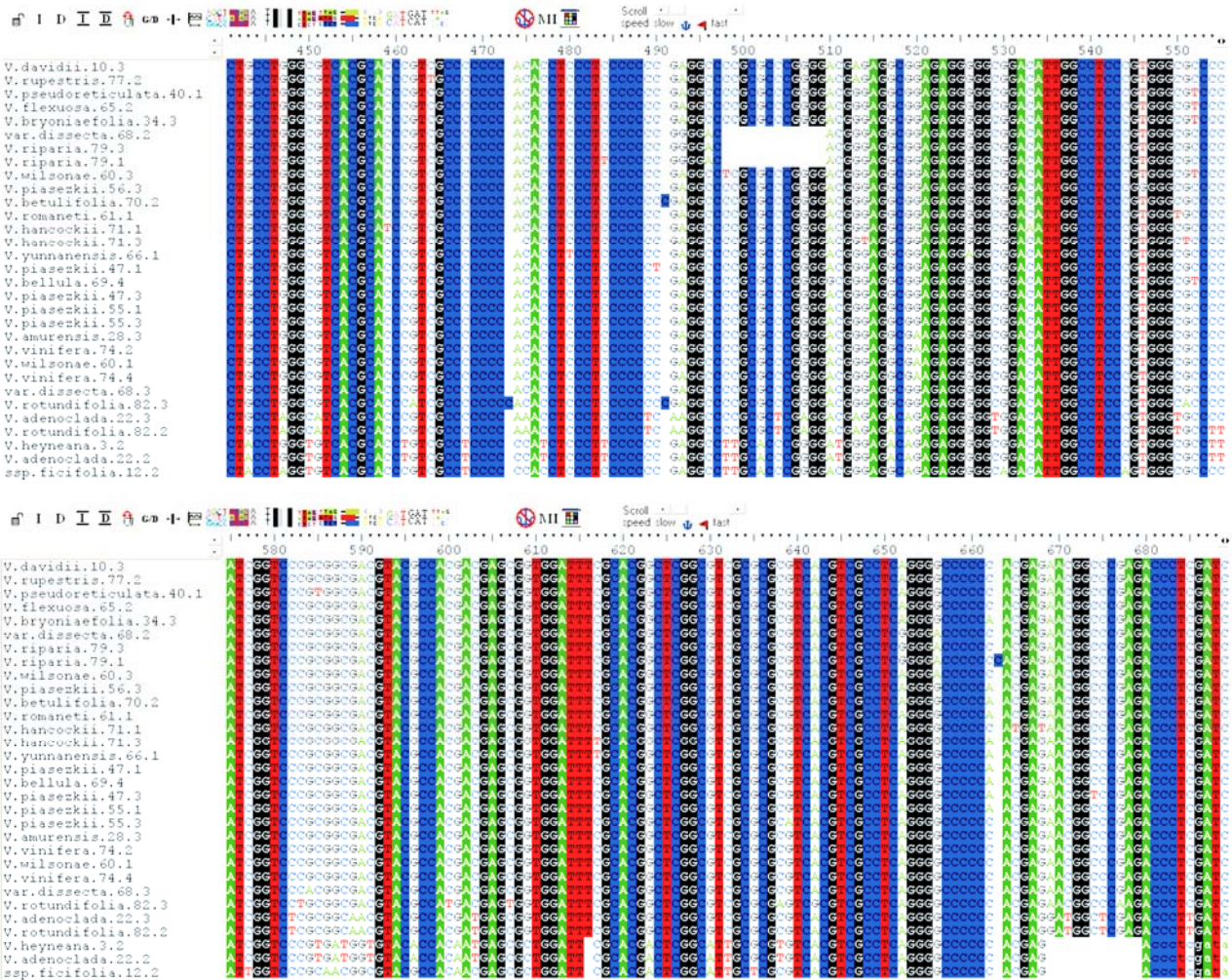


图 2 30 个 ITS 序列克隆的部分序列比对结果
 Figure 2 Partial Sequence alignment results from 30 ITS sequence data

在分支 D 中, ‘变叶葡萄 0958’、‘灵宝秋葡萄’、‘都安毛葡萄’、‘云南葡萄 01’、‘腺毛变叶’、‘嵩县桦叶葡萄’、‘桑叶葡萄 943’、‘罗城腺枝 01’、‘菱叶葡萄 0945’和‘山葡萄 0933’9 个种的亲缘关系较近, 其中山葡萄、毛葡萄为广泛分布种, 在国内 20 个省均有分布, 变叶葡萄、桦叶葡萄、桑叶葡萄、腺枝葡萄、秋葡萄在国内 10 个以上的省份中分布, 菱叶葡萄和云南葡萄分布范围狭窄(孔庆山, 2004)。上述种在地理分布及形态特征上均存在较大差异, 但其亲缘关系较近, 推测上述 9 个种在进化过程中具有共同的母本祖先, 并随着不同种间基因的交流和对各自生存环境的适应而发生进化。‘湖南刺葡萄’、‘美丽葡萄 1104’、‘卢氏网脉 02’、‘葛藟 0943’、‘华东葡萄 1057’、‘灵宝变叶 01’、‘燕山葡萄 0947’、‘舞钢庙街蓼蓂’和分枝 D 各为一类, 呈并列关系, 各自独立进化。上述结果表

明我国葡萄属种质资源的遗传多样性较为丰富, 是阐明世界葡萄起源、演化和生物多样性必不可少的重要证据。

2.2 ITS 序列聚类分析

植物体中存在数以万计的核糖体基因拷贝的串联重复, 而 ITS 序列在协同进化(Concerted evolution)过程中的均质化不完全和假基因的存在等原因, 可能会在同一个体内存在多个 ITS 序列(A lvarez and Wendel, 2003)。在 PCR 过称中添加 4% 的 DMSO 能够有效除去假基因(郑小艳等, 2006), 但‘灵宝变叶 01’、‘变叶葡萄 0958’、‘卢氏网脉 02’、‘燕山葡萄 0947’、‘菱叶葡萄 0945’、‘玫瑰香’、‘河岸葡萄 6402’和‘代克赛’仍存在多重核糖体 DNA 序

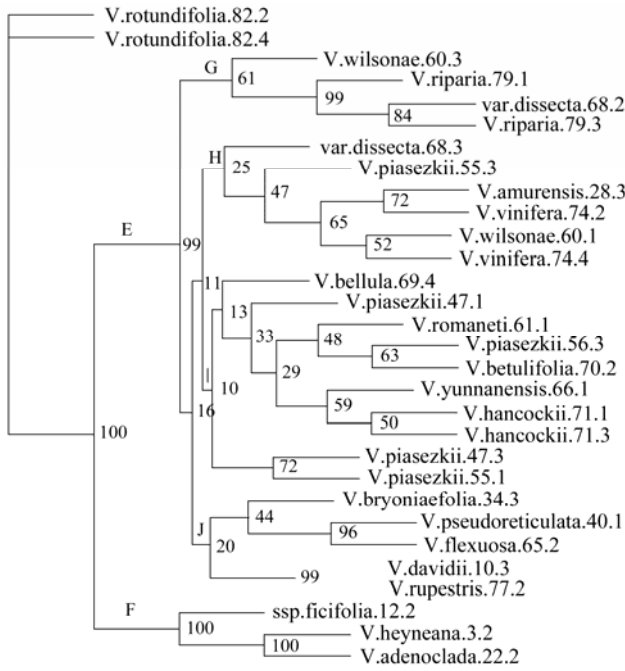


图3 由22个葡萄属植物基因型的30个ITS序列克隆构建的最大简约树

注: 树长=333, 一致性指数=0.8481, 保留指数=0.8691; 分支上的数字是1000次自展的数据支持率

Figure 3 Maximum parsimonious tree for 22 genotypes of *vitis* materials obtained from 30 ITS sequence data

Note: The tree has a length of 333 steps, a consistency index(CI) of 0.8481, retention index (RI) of 0.8691; Numbers above the branches are bootstrap values (%) of 1000 replications

列, ITS 测序得到的 3 个克隆有 2 个克隆相同, 这与小麦族中不同品种之间存在主要和次要两种核糖体 DNA 的结果相同(Dubcovsky and Dvorak, 1995), 由于受到多重核糖体 DNA 序列影响, ITS 序列所反映的亲本信息较为复杂, 并且在系统进化树的构建中存在塌陷(collapse)现象, 试验所构建的 ITS 树只能够部分揭示 22 份材料之间的亲缘关系。

2.3 部分样本亲缘关系

分枝 F 中, 毛葡萄、腺枝葡萄和桑叶葡萄 3 者的亲缘关系在学者之间存有不同意见, 有认为桑叶葡萄是毛葡萄的亚种, 也有认为桑叶葡萄应作为独立的种处理(孔庆山, 2004)。桑叶葡萄与毛葡萄的形态特征差异较大, 而腺枝葡萄与毛葡萄的差异小, 仅按照腺毛的有无来确定分类地位。图 1 显示 3 个种聚在一起, 亲缘关系较近, 图 2 中毛葡萄与腺枝

葡萄亲缘关系较桑叶葡萄近, 上述结果与王文采观点一致(王文采, 1979), 认为桑叶葡萄应作为一个独立的种来对待。毛葡萄是我国葡萄属植物中较为原始类型(晁无疾和袁志发, 1990), 分枝 F 表明毛葡萄、腺枝葡萄和桑叶葡萄独立聚类且与其它葡萄属植物的亲缘关系较远(BS 100%), 也说明上述 3 种较早的从原始种中发生独立进化。

分枝 G 中, ‘燕山葡萄 0947’是上世纪 80 年代河北昌黎果树所提供的燕山葡萄实生种子生长的单株, 是两性花, 扦插容易生根, 与中国野生葡萄为雌雄异株以及扦插难以生根的特点不符; 中国野生葡萄不具美洲种群抗葡萄根瘤蚜的特性, 而前期试验结果表明‘燕山葡萄 0947’对葡萄根瘤蚜具有一定的抗性(张化阁等, 2009), 叶绿体树中‘var. dissecta.68’和中国野生葡萄聚在一起, ITS 树中‘var. dissecta.68.2’先‘V. riparia.79.3’聚在一起后又和‘V. riparia.79.1’聚在一起(自展支持值分别为 84%和 99%), 因此, 推测‘燕山葡萄 0947’是母本为中国野生葡萄的一个种, 父本为河岸葡萄的种间杂种。

分枝 H 中, 欧亚种葡萄‘玫瑰香’的花粉形态研究表明其与起源于我国的山葡萄有一定的亲缘关系(刘三军等, 1997), 叶绿体树中显示‘V. amurensis.28’和‘V. vinifera.74’亲缘关系较远, ITS 树中‘V. amurensis.28.3’和‘V. vinifera.74.2’聚在一起(BS 72%)。结合母本和双亲信息可知玫瑰香与山葡萄的母本亲缘关系较远, 父本亲缘关系较近。

分枝 I 中, ‘灵宝变叶 01’和‘变叶葡萄 0958’亲缘关系较近(BS 72%), 与其形态性状分类结果一致(牛立新和贺普超, 1996)。

分枝 J 中, ‘华东葡萄 1057’和‘葛藟 0943’聚在一起(BS 96%), 与形态性状分类结果一致(牛立新和贺普超, 1996)。“湖南刺葡萄”和“沙地葡萄 0904”亲缘关系较近(BS 99%), 在前人的研究中未见报道。结合母本和双亲信息推测, 二者母本亲缘关系较远, 而父本亲缘关系较近。

由于 ITS 树在聚类过程中存在支持值较低(<50%), ‘var. dissecta.68.3’、‘V. bellula.69.4’和‘V. piasezkii.55.3’等一些材料的聚类结果值得商榷, 需要结合形态学特征和其它分类手段进行研究。

3 材料和方法

3.1 材料

试验中的 22 份材料包括 18 份中国野生葡萄, 1 份欧亚种, 2 份美洲种和 1 份圆叶葡萄亚属, 均

来源于中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质郑州葡萄资源圃(表 3)。

表3 用于系统进化分析的葡萄材料

Table 3 *Vitis* materials used for phylogenetic analysis

名称 Name	种名 Species	ITS 树中名称 Name in ITS tree	叶绿体树中名称 Name in chloroplastid tree
都安毛葡萄 Duanmaoputao	毛葡萄 <i>V. heyneana</i> Roem.& Schult.	<i>V. heyneana</i> .3.2	<i>V. heyneana</i> .3
湖南刺葡萄 Hunanciputao	刺葡萄 <i>V. davidii</i> (Roman.du Caill.) Foëx.	<i>V. davidii</i> .10.3	<i>V. davidii</i> .10
桑叶葡萄 943 Sangyeputao 943	桑叶葡萄 <i>V. heyneana</i> Roem. & Schult subsp. <i>ficifolia</i> (Bge.) C.L.Li	ssp. <i>ficifolia</i> .12.2	ssp. <i>ficifolia</i> .12
罗城腺枝 01 Luochengxianzhi 01	腺枝葡萄 <i>V. adenoclada</i> Hand.-Mazz..	<i>V. adenoclada</i> .22.2	<i>V. adenoclada</i> .22
山葡萄 0933 Shanputao 0933	山葡萄 <i>V. amurensis</i> Rupr.	<i>V. amurensis</i> .28.3	<i>V. amurensis</i> .28
舞钢庙街蓼萸 Wugangmiaojieyingyu	蓼萸葡萄 <i>V. bryoniaefolia</i> Bge.	<i>V. bryoniaefolia</i> .34.3	<i>V. bryoniaefolia</i> .34
华东葡萄 1057 Huadongputao 1057	华东葡萄 <i>V. pseudoreticulata</i> W.T.Wang.	<i>V. pseudoreticulata</i> .40.1	<i>V. pseudoreticulata</i> .40
灵宝变叶 01 Lingbaobianye 01	变叶葡萄 <i>V. piasezkii</i> Maxim.	<i>V. piasezkii</i> .47.1 <i>V. piasezkii</i> .47.3	<i>V. piasezkii</i> .47
变叶葡萄 0958 Bianyeputao 0958	变叶葡萄 <i>V. piasezkii</i> Maxim.	<i>V. piasezkii</i> .55.1 <i>V. piasezkii</i> .55.3	<i>V. piasezkii</i> .55
腺毛变叶 Xianmaobianye	变叶葡萄 <i>V. piasezkii</i> Maxim.	<i>V. piasezkii</i> .56.3	<i>V. piasezkii</i> .56
卢氏网脉 02 Lushiwangmai 02	网脉葡萄 <i>V. wilsonae</i> Veitch.	<i>V. wilsonae</i> .60.1 <i>V. wilsonae</i> .60.3	<i>V. wilsonae</i> .60
灵宝秋葡萄 Lingbaoqiuputao	秋葡萄 <i>V. romaneti</i> Roman.du Caill.ex Planch.	<i>V. romaneti</i> .61.1	<i>V. romaneti</i> .61
葛藟 0943 Gelei 0943	葛藟葡萄 <i>V. flexuosa</i> Thunb.	<i>V. flexuosa</i> .65.2	<i>V. flexuosa</i> .65
云南葡萄 01 Yunnanputao01	云南葡萄 <i>V. yunnanensis</i> C.L.Li.	<i>V.yunnanensis</i> .66.1	<i>V.yunnanensis</i> .66
燕山葡萄 0947 Yanshanputao 0947	燕山葡萄 <i>V. amurensis</i> Rupr.var. <i>dissecta</i> Skvorts.	var. <i>dissecta</i> .68.2 var. <i>dissecta</i> .68.3	var. <i>dissecta</i> .68
美丽葡萄 1104 Meiliputao 1104	美丽葡萄 <i>V. bellula</i> (Rehd.) W.T.Wang	<i>V. bellula</i> .69.4	<i>V. bellula</i> .69
嵩县桦叶葡萄 Songxianhuayeputao	桦叶葡萄 <i>V. betulifolia</i> Diels & Gilg.	<i>V.betulifolia</i> .70.2	<i>V.betulifolia</i> .70.2
菱叶葡萄 0945 Lingyeputao 0945	菱叶葡萄 <i>V. hancockii</i> Hance.	<i>V. hancockii</i> .71.1 <i>V. hancockii</i> .71.3	<i>V. hancockii</i> .71
玫瑰香 Muscat Hamburg	欧亚种 <i>V. vinifera</i> L.	<i>V. vinifera</i> .74.2 <i>V. vinifera</i> .74.4	<i>V. vinifera</i> .74
沙地葡萄 0904 Rupestris 0904	沙地葡萄 <i>V. rupestris</i> Scheele.	<i>V. rupestris</i> .77.2	<i>V. rupestris</i> .77
河岸葡萄 6402 Riparia 6402	河岸葡萄 <i>V. riparia</i> Michx.	<i>V. riparia</i> .79.1 <i>V. riparia</i> .79.3	<i>V. riparia</i> .79
代克赛 Dixie	圆叶葡萄 <i>V. rotundifolia</i>	<i>V. rotundifolia</i> .82.2 <i>V. rotundifolia</i> .82.4	<i>V. rotundifolia</i> .82

3.2 DNA 的提取扩增和测序

采用改良的CTAB法从葡萄嫩叶中提取基因组DNA(王姣, 2008), 在1%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 使用 Bio-Photometer *plus* 核酸定量仪(Eppendorf)检测基因组DNA的浓度和纯度, 并将浓度稀释至30~50ng/ μ L。

叶绿体和ITS序列信息(表4)。

20 μ L PCR扩增体系包括: 30~50 ng DNA模板,

2 μ L 10 \times PCR Buffer, 其它反应试剂及PCR反应程序(表5)。利用胶回收及纯化试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)完成PCR产物的纯化。ITS序列的克隆、测序选用pGEM-T载体(Promega)和DH5 α 感受态细胞(天根生化科技有限公司)完成。目标序列的连接、转化, 经菌落PCR验证, 得到阳性克隆, 每份材料选择3个克隆进行测序。

表4 cpDNA和ITS片段的引物信息

Table 4 The primer information of the cpDNA and ITS fragment

名称	引物	序列	参考文献
Name	Primer	Sequenc	Reference
<i>AtpF-atpH</i>	AtpF	5'-ACT CGC ACA CAC TCC CTT TCC-3'	Kim Ki-Joong, 2007;
	AtpH	5'-GCT TTT ATG GAA GCT TTA ACA AT-3'	Pennisi, 2007
<i>TrnH-psbA</i>	PsbA	5'-GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C-3'	Shaw et al., 2005
	TrnHGUG	5'-CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC-3'	
<i>TrnT-trnL</i>	A	5'-CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT-3'	Taberlet et al., 1991
	B	5'-TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC-3'	
ITS	P1	5'-TCG CGA GAA GTC CAC TGA-3'	Wang L., and Zhuo L.H.,
	P2	5'-ATG CTT AAA CTC AGC GGG-3'	2006

表5 cpDNA和ITS片段的PCR扩增体系和反应程序

Table 5 PCR amplification system and cycling conditions used to amplify the cpDNA and ITS fragment

引物名称 Primer name	PCR 扩增体系 PCR amplification system				PCR 反应程序 PCR cycling conditions		
	Mg ²⁺ (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	引物浓度(μ mol/L) Primer concentration (μ mol/L)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 <i>Taq</i> DNA Polymerase	预变性 Predenature	35 个循环 35 cycles	延伸 Elongate
<i>AtpF-atpH</i>	1.5	0.2	0.4	0.5U	94°C 5 min	94°C 30 sec, 51°C 40 sec, 72°C 40 sec	72°C 7 min
<i>TrnH-psbA</i>	1.5	0.2	0.4	0.5U	94°C 5 min	94°C 30 sec, 55°C 40 sec, 72°C 1.5 min	72°C 7 min
<i>TrnT-trnL</i>	2.0	0.2	0.35	1U	94°C 5 min	94°C 30sec, 62°C 1 min, 72°C 1 min	72°C 7 min
ITS	1.5	0.2	0.5	2U	94°C 5 min	94°C 30 sec, 52°C 30 sec, 72°C 1 min	72°C 9 min

注: 在 *trnT-trnL* 和 ITS 的扩增体系中添加 BSA(终浓度为 0.1g/L); 在 ITS 的扩增体系中添加 DMSO (为总反应体积的体系的 4%)

Note: Add BSA to *trnT-trnL* and ITS PCR reaction mix (final concentration was 0.1g/L); Add DMSO to ITS-PCR reaction mix (4% of total reaction volume)

3.3 DNA 分析方法

将得到的序列用 Contig Express Computer Program (InforMax, Inc., Bethesda, MD)软件进行拼接, 通过与 GeneBank 上已知葡萄的 cpDNA 全序列 (DQ424856.1)比较后, 确定扩增序列的正确性。用 Clustal X 1.83 软件对序列进行比对(Thompson et al., 1997), 再用 Bioedit 7.0.9 进行序列手工校对(Hall, 1999), 使用 Mega 5.0 计算碱基组成, 包括 GC 含量、保守位点、变异位点和信息位点(Tamura et al., 2007)。利用 PAUP * 4.0b10 软件, 以圆叶葡萄亚属 *Dixie* 为外类群对比对后的序列采用最大简约数法(Maximum Parsimony, MP)进行系统发育分析(Swofford, 2000), 为搜索最简约 MP 树, 采用启发式搜索(heuristic searches), 树二等分再连接分支交换(TBR), 各种核酸替代等同加权, 对由于序列多态性造成的空位(Gaps)处理作缺失(Missing)状态。序列添加采用随机方式(Random), 拓扑结构的可靠性用 1000 次重复的自展检验(Bootstrap analysis)来评估(Felsenstein, 1985)。

作者贡献

张永辉、樊秀彩和张颖是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 张永辉、孙海生及姜建福完成数据分析, 论文初稿的写作; 刘崇怀是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-30-yz-1)资助。作者感谢中国农业科学院郑州果树研究所鲁振华老师和彭斌老师在本实验过程中的技术支持和有益的建议。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

参考文献

A'lvarez I., and Wendel J.F., 2003, Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3): 417-434

Chao W.J., and Yuan Z.F., 1990, Discussion on classification and relationship of chinese wild species of grape, *Xibei Nongye Daxue Xuebao (Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry)*, 18(2): 7-12 (晁无疾, 袁志发, 1990, 我国葡萄属植物分类与亲缘关系的探讨, *西北农业大学学报*, 18(2): 7-12)

Dubcovsky J., and Dvorak J., 1995, Ribosomal RNA multigene loci: Nomads of the triticeae genomes, *Genetics*, 140(4): 1367-1377

Felsenstein J., 1985, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution*, 39(4): 783-791

Hall T.A., 1999, Bioedit: A use-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98

He Y.H., Li C.L., and Cao Y.L., 1994, Comparative anatomy of vegetative organs in the genus *Vitis* L. and its systematic significance, *Zhiwu Fenlei Xuebao (Acta Phytotaxonomica Sinica)*, 32(2): 154-164 (何永华, 李朝奎, 曹亚玲, 1994, 葡萄属营养器官的比较解剖学及其系统学意义, *植物分类学报*, 32(2): 154-164)

Kondo K., Shiba M., Yamaji H., Morota T., Zhengmin C., Huixia P., and Shoyama Y., 2007, Species identification of licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers, *Biol. Pharm. Bull.*, 30(8): 1497-1502

Kong Q.S., eds., 2004, *Chinese ampelography*, China Agricultural Scientific and Technical Press, Beijing, China, pp.25-31(孔庆山, 编著, 2004, *中国葡萄志*, 中国农业科学技术出版社, 中国, 北京, pp.25-31)

Li C.L., Cao Y.L., and He Y.H., 1996, A taxonomical study on *Vitis* L. in China, *Yingyong Yu Huanjing Shengwu Xuebao (Chinese Journal of Applied & Environmental Biology)*, 2(3): 234-253 (李朝奎, 曹亚玲, 何永华, 1996, 中国葡萄属(*Vitis* L.)分类研究, *应用与环境生物学报*, 2(3): 234-253)


Li X.M., Xie R.J., Lu Z.H., and Zhou Z.Q., 2010, The origin of cultivated citrus as inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequence and amplified fragment length polymorphism fingerprints, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(4): 341-350

Liu S.J., Kong Q.S., and Gu H., 1997, Studies on the taxonomy of wild grape species native to china by the palynology, *Guoshu Kexue (Journal of Fruit Science)*, 14(2): 100-105 (刘三军, 孔庆山, 顾红, 1997, 我国葡萄属植物孢粉学分类研究, *果树科学*, 14(2): 100-105)

Luo Y., Zhang F.M., and Yang Q.E., 2005, Phylogeny of *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae) inferred from ITS sequences, *Plant Systematics and Evolution*, 252(1-2): 11-25

Ma Z.S., and He P.C., 1998, A Study on the taxonomy and relationship of wild *Vitis* native to china with POD isozyme, *Huabei Nongxuebao (Acta Agriculturae Boreali-Sinica)*, 13(2): 122-126 (马之胜, 贺普超, 1998, 用过氧化物同工酶对中国葡萄属野生种分类和亲缘关系的研究, *华北农学报*, 13(2): 122-126)

- Niu L.X., and He P.C., 1996, Taxonomy classification of chinese wild *Vitis* plants, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 23(3): 209-212 (牛立新, 贺普超, 1996, 我国野生葡萄属植物系统分类研究, *园艺学报*, 23(3): 209-212)
- Pennisi E., 2007, Wanted: A barcode for plants, *Science*, 318(5848): 190-191
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W.S., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., and Small R.L., 2005, The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis, *American Journal of Botany*, 92(1): 142-166
- Swofford D.L., 2000, PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods) Version 4b. Sinauer, Associates, Sunderland, MA.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., and Bouvet J., 1991, Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology*, 17(5): 1105-1109
- Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S., 2007, MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0, *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596-1599
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., and Higgins D.G., 1997. The CLUSTAL-X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876-4882
- Tröndle D., Schröder S., Kassemeyer H.H., Kiefer C., Koch M.A., and Nick P., 2010, Molecular Phylogeny of the genus *vitis* (Vitaceae) based on plastid markers, *American Journal of Botany*, 97(7): 1168-1178
- Wang A., Schluetz F., and Liu J., 2008, Molecular evidence for double maternal origins of the diploid hybrid *Hippophae gonioarpa* (Elaeagnaceae), *Botanical Journal of Linnean Society*, 156(1): 111-118
- Wang J., 2008, Researches on the biodiversity of the morphology and polymorphy based on SSR markers of *Vitis ficifolia* Bge. native to Henan province in China, Thesis for M.S., Chinese Academy of Agricultural Sciences, Supervisor: Liu C.H., pp.14-15 (王姣, 2008, 河南境内桑叶葡萄(*Vitis ficifolia* Bge.)种内形态和遗传多样性分析, 硕士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 刘崇怀, pp.14-15)
- Wang L., and Zhuo L.H., 2006, systematic classification of some species of *Iris* based on ITS sequences, *Dongbei Linye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Forestry University)*, 34(4): 54-56, 75 (王玲, 卓丽环, 2006, 基于 ITS 序列的鸢尾属植物部分种的系统分类, *东北林业大学学报*, 34(4): 54-56, 75)
- Wang W.C., 1979, Vitacearum novitates, *Zhiwu Fenlei Xuebao (Acta.Phytotaxonomica Sinica)*, 17(3): 73-98 (王文采, 1979, 葡萄科的新发现, *植物分类学报*, 17(3): 73-98)
- Wang X.Q., and Hong D.Y., 1997, Progress in molecular systematics of plants in recent five years, *Zhiwu Fenlei Xuebao (Acta.Phytotaxonomica Sinica)*, 35(5): 465-480 (汪小全, 洪德元, 1997, 植物分子系统学近五年的研究进展概况, *植物分类学报*, 35(5): 465-480)
- Zhang H.G., Liu C.H., Wang Z.Y., Zhong X.H., Fan X.C., and Dong D.D., 2009, Identification of the resistance to grape phylloxera of Chinese wild grape species, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 26(3): 306-310 (张化阁, 刘崇怀, 王忠跃, 钟晓红, 樊秀彩, 董丹丹, 2009, 中国野生葡萄抗葡萄根瘤蚜的特性鉴定, *果树学报*, 26(3): 306-310)
- Zhang L.P., Lin B.N., Shen DX., and Wu P., 1998, Taxonomy of *Vitis* by RAPD, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 25(2): 191-193 (张立平, 林伯年, 沈德绪, 吴平, 1998, 葡萄属 RAPD 分类研究, *园艺学报*, 25(2): 191-193)
- Zheng X.Y., Cai D.Y., and Teng Y.W., 2006, The influence of ITS-PCR amplification and sequence for *Pyrus* with DMSO, In: Chinese youth society of horticulture, seventh symposium (ed.), *Advances in horticulture(VII)*, Beijing: China Agricultural Press, pp.141-146 (郑小艳, 蔡丹英, 腾元文, 2006, DMSO对梨属植物ITS区扩增及测序的影响, 见: 中国园艺学会第七届青年学术讨论会(编著), *园艺学进展(VII)*, 中国农业出版社, 北京, pp.141-146)

 5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>