

· 研究报告 ·

山葡萄种质资源DNA条形码通用序列的筛选

宋慧芳, 刘海双, 杨义明, 范书田, 李昌禹*, 艾军*

中国农业科学院特产研究所, 长春 130112

摘要 对山葡萄(*Vitis amurensis*)种质资源样品的ITS、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*和*matK*序列进行PCR扩增及测序, 优化PCR反应的退火温度, 比较各序列的扩增效率、测序成功率、品种间和品种内的差异及barcoding gap图, 使用BLAST和NJ树法比较不同序列的鉴定能力, 最终从5条DNA片段中筛选出可用于山葡萄种质资源鉴定的DNA条形码通用序列。结果表明, 在采集的11份33个山葡萄样品中, *psbA-trnH*和ITS2序列的扩增与测序成功率较高, 其品种间、品种内差异及barcoding gap较ITS、*rbcL*和*matK*序列具有明显的优势, 且ITS2序列能够鉴别*psbA-trnH*序列无法鉴别的品种。实验证明, ITS2和*psbA-trnH*序列是较适合鉴别山葡萄资源的DNA条形码序列组合。DNA条形码弥补了形态学鉴定的不足, 可为山葡萄种质资源的准确鉴定提供科学依据。

关键词 山葡萄, DNA条形码, 鉴定, ITS2, *psbA-trnH*, 序列

宋慧芳, 刘海双, 杨义明, 范书田, 李昌禹, 艾军 (2017). 山葡萄种质资源DNA条形码通用序列的筛选. 植物学报 52, 723–732.

山葡萄(*Vitis amurensis*)属于东亚种群, 为葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis*)落叶藤本, 是葡萄属中最抗寒的一个种。其枝蔓可耐–45℃低温, 根系可耐–16℃低温, 原产于我国东北、华北及朝鲜北部、俄罗斯远东地区等(宋润刚等, 2009; 李晓艳等, 2014)。野生山葡萄资源在我国长白山和小兴安岭山脉极为丰富, 是我国野生果树驯化栽培最成功的树种之一。山葡萄浆果营养价值丰富, 同时是酿造高档葡萄酒的优质原料, 纯种山葡萄也对白粉病及白腐病等有较强的抵抗力, 是国内外培育抗寒、抗病、优质新品种的宝贵种质资源及砧木育种资源。目前中国农业科学院特产研究所、吉林省农业科学院果树研究所、中国农业科学院郑州果树研究所以及西北农林科技大学等单位保存部分山葡萄种质资源。农业部于1988年出资建立了国家果树种质左家山葡萄圃, 该圃挂靠于中国农业科学院特产研究所, 现保存种质资源400余份, 主要来自黑龙江、吉林、辽宁和河北等地, 其中从黑龙江收集的资源占65%以上, 包括在世界范围内首次发现的四倍体山葡萄种质4N1和两性花山葡萄种质双庆(沈育杰等, 2006)。左家山葡萄圃保存的山葡萄种质份数为世界之最, 已成为全国山葡萄生产示范和

优良品种推广基地及山葡萄种质资源教学、研究及利用平台。因此, 对山葡萄种质资源进行鉴定具有重要意义。

DNA条形码(DNA barcoding)是应用一种相对较短、易扩增且有足够变异的DNA序列来进行物种分类鉴别的分子生物学技术(Hebert et al., 2003)。该技术由加拿大动物学家Hebert等(2003)首次提出, 并分析了动物界11个门13 320个物种的CO1 (cytochrome oxidase subunit 1)基因序列, 发现利用该序列种间变异能够对物种进行鉴定。自此, CO1基因成为动物界中标准的DNA条形码基因。而在植物中CO1基因进化较慢, 虽然各种DNA条形码在不同植物中都有研究, 但并没有发现能够鉴别所有物种的标准序列。CBOL Plant Working Group (2009)通过大量的研究, 提出将*rbcL*+*matK*序列组合作为植物分子鉴定的核心条形码, 中国植物条形码研究组选取1 757种植物对*psbA-trnH*、ITS/ITS2及*rbcL*+*matK*序列/序列组合进行鉴别能力评价, 并提出将ITS/ITS2序列作为种子植物的核心条形码(China Plant BOL Group et al., 2011)。Vinitha等(2014)对姜科7属20个种的60份样本进行分析, 发现ITS序列在测试样本中的鉴定成功率

收稿日期: 2016-12-02; 接受日期: 2017-01-24

基金项目: 农业部物种资源保护(农作物)项目(No.2016NWB043)和国家现代农业产业技术体系建设专项(No.CARS-30-7)

* 通讯作者。E-mail: lcy_lcy2002@163.com; aijun1005@163.com

较高。目前,已证明ITS、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*、*matK*和*rbcL+matK*这几个候选序列/序列组合扩增成功率 and 物种识别率较高,通用性较好,是植物条形码研究中重点推荐的候选序列(任保青和陈之端, 2010; 王柯等, 2011)。由于目前多数研究都在某一物种的种及以上水平,因此要确定某一植物科、属、种及品种合适的DNA条形码序列就要进行深入研究和筛选。

我国山葡萄种质资源丰富,目前资源鉴定都以形态学标记为主,这种方法虽然简单但易受到季节变化、栽培管理方式、环境因子和主观判断因素的影响,致使苗木市场出现同名异物、同物异名的现象,严重影响了山葡萄产业的发展。山葡萄种质资源的鉴别是目前研究和资源利用的难题之一。本实验采用5个DNA条形码候选序列,并选取山葡萄种质资源11个品种33份样本进行比较,验证各序列对山葡萄品种间的鉴别能力,为DNA条形码技术应用于山葡萄资源鉴定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选取山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)种质11份资源品种(表1),其中包括性状表现良好的雌能花、两性花、四倍体及雄花共33个样品。设3次重复。供试材料均采自中国农业科学院特产研究所国家果树种质左家山葡萄圃。按照山葡萄圃栽植图进行采集,并将采集的新鲜叶片标记编号后置于变色硅胶中迅速

干燥。

1.2 方法

1.2.1 总DNA提取、PCR扩增和测序

称取经硅胶干燥的山葡萄叶片20 mg,加入液氮充分碾磨,使用植物基因组DNA提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., China)提取总DNA,并用1×TE洗脱。DNA提取产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.7–1.9之间。PCR反应体系总体积为25 μL,包括DNA模板1 μL (30 ng),正反向引物各1 μL (2.5 μmol·L⁻¹), 2×PCR reagent 12.5 μL (0.1 U *Taq* plus polymerase·μL⁻¹, 500 μmol·L⁻¹ dNTP each, 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.3), 100 mmol·L⁻¹ KCl, 3 mmol·L⁻¹ MgCl₂), 双蒸水9.5 μL。PCR扩增程序及通用引物参考Chen等(2010)的方法。为提高扩增效果,我们对PCR反应条件进行了优化,将退火温度设置为8个梯度,选择对山葡萄资源扩增效果最佳的退火温度进行PCR反应(表2)。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,用TIANGel Midi纯化试剂盒(Tiagen Biotech Co. Ltd, Beijing, China)进行纯化,在ABI-3730XL测序仪上直接进行测序。

1.2.2 数据处理

使用SeqMan (DNA Star package; DNA Star Inc., Madison, WI, USA)软件进行测序峰图校对拼接,去除低质量序列及引物区。利用Clustal X-2.0.11-Win软件(Larkin et al., 2007)进行多序列比对,并对部分

表1 山葡萄品种信息
Table 1 Information of *Vitis amurensis* varieties

Number	Varieties name	Locality of origin	Parents or source	Flower type
1	Zuoyouhong	Zuojia, Jilin	Varieties	Bisexual
2	Shuanghong	Zuojia, Jilin	Varieties	Bisexual
3	Zuoshan1	Zuojia, Jilin	Wild resource	Male
4	Zuoshan2	Zuojia, Jilin	Wild resource	Male
5	4N1	Zuojia, Jilin	Genetic material	Tetraploid
6	4N2	Zuojia, Jilin	Genetic material	Tetraploid
7	Shuangqing	Zuojia, Jilin	Varieties	Bisexual
8	Shuangfeng	Zuojia, Jilin	Varieties	Bisexual
9	Shuangyou	Ji'an, Jilin	Varieties	Bisexual
10	75047	Shangzhi, Heilongjiang	Wild resource	Female
11	73061	Dunhua, Jilin	Wild resource	Female

表2 山葡萄DNA条形码标记引物序列及退火温度

Table 2 The primer information and annealing temperature of PCR from *Vitis amurens*

Fragment	Eight annealing temperature gradient (°C)	Annealing temperature (°C)
ITS2	54.8–55.4–56.0–56.6–57.2–57.8–58.4–59.0	56.0
<i>psbA-trnH</i>	52.2–52.8–53.4–54.0–54.6–55.2–55.8–56.4	55.2
<i>matK</i>	48.9–49.5–50.1–50.7–51.3–51.9–52.5–53.1	50.1
<i>rbcL</i>	52.1–52.7–53.3–53.9–54.5–55.1–55.7–56.3	54.5
ITS	49.9–50.5–51.1–51.7–52.3–52.9–53.5–54.1	52.9

序列进行手工调整。切除ITS2序列的5.8S和26S区段(HM-Mer模型), 去除*psbA-trnH*序列的*psbA*和*trnH*区段, 使其获得间隔区序列。用MEGA 5.0软件对各序列进行Clustal W计算, 并计算K-2-P距离值, 比较不同序列品种间和品种内变异, 分析核苷酸含量比例。利用SPSS 18.0软件对计算结果进行Wilcoxon Signed-rank检验。利用TAXON DNA软件(Slabbinck et al., 2008)作barcoding gap图。采用相似性搜索算法BLAST以及NJ (neighbor joining)树计算鉴定效率(Ross et al., 2008)。

2 结果与讨论

2.1 PCR扩增程序的优化

为提高山葡萄资源的扩增成功率, 在进行PCR反应前先对候选序列ITS、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*和*matK*(陈士林等, 2013)的退火温度进行优化, 分别在45–60°C之间以0.6°C为梯度设置8个梯度(表2)。根据1.5%琼脂糖凝胶电泳检测的扩增效果(图1)进行筛选。

2.2 PCR扩增效率和测序成功率

本实验统计了5个候选序列的PCR扩增效率、测序成功率及有效序列的获得率(表3)。其中, ITS2、*matK*和*psbA-trnH*的扩增效率均为100%, 测序成功率大小依次为*psbA-trnH*>ITS2>*matK*>*rbcL*>ITS。*psbA-trnH*的有效序列为100%; ITS2和*matK*的有效序列比例为96.9%; *rbcL*为88.1%。由于Chen等(2010)得出nrDNA ITS2序列在山葡萄资源33个样本中扩增成功率较高, 而ITS引物的有效序列仅成功扩增5个山葡萄品种, 故我们对ITS不作深入研究。

2.3 不同序列的品种内及品种间差异

通过测序结果分析比对序列特征, 计算平均变异位点

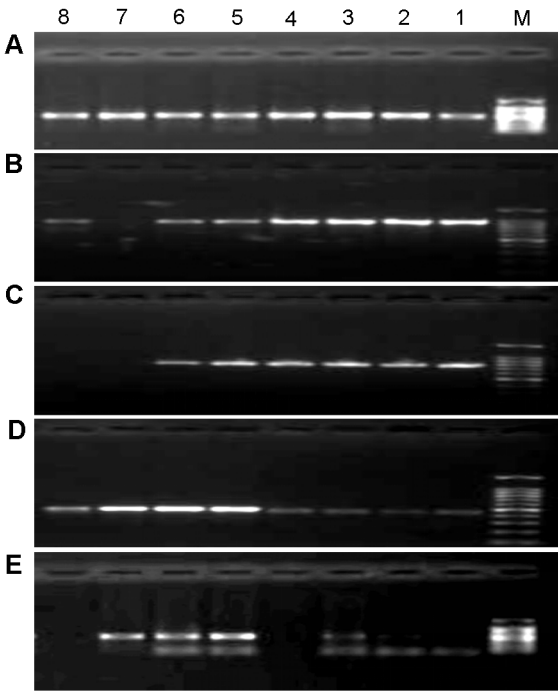


图1 5个候选序列PCR反应的梯度退火温度 (A) ITS2; (B) *matK*; (C) *rbcL*; (D) *psbA-trnH*; (E) ITS。M: DNA marker DL2000; 1–8: 45–60°C之间的温度梯度

Figure 1 Gradient annealing temperature of PCR reaction of 5 candidate sequences (A) ITS2; (B) *matK*; (C) *rbcL*; (D) *psbA-trnH*; (E) ITS. M: DNA marker DL2000; 1–8: Gradient annealing temperature among 45–60°C

数、品种间差异、平均品种内差异及GC含量, 并将序列组合进行比对分析。结果(表4)表明, 各序列变异位点数由大到小依次为ITS2>*psbA-trnH*>*rbcL*>*matK*, GC含量ITS2>*matK*>*rbcL*>*psbA-trnH*, *psbA-trnH*和ITS2序列的品种间变异最大, *rbcL*序列次之, *matK*序列最小, 与*psbA-trnH*或ITS2序列组合的序列组品种间变异也相应变大; 品种内变异*rbcL*与*psbA-trnH*序

表3 不同DNA条形码序列扩增获得的有效序列比例
Table 3 The effective sequence ratio obtained by PCR amplification of five DNA barcode sequences

Marker	Amplification efficiency (%)	Sequencing success rate (%)	Effective sequence ratio (%)
ITS2	100.0	96.9	96.9
<i>matK</i>	100.0	96.9	96.9
<i>psbA-trnH</i>	100.0	100.0	100.0
<i>rbcL</i>	96.9	90.9	88.1
ITS	45.5	30.3	13.8

扩增出明显PCR条带即为成功; 测序后获得高质量的序列即为测序成功; 有效序列比例=PCR扩增效率×测序成功率(王柯等, 2011)。

Clear PCR bands were successfully amplified; High-quality sequence is a successful sequencing; Effective sequence ratio=PCR amplification efficiency×sequencing success rate (Wang et al., 2011, in Chinese).

列最大, *matK*序列次之, ITS2序列最小, 与*rbcL*和*psbA-trnH*序列组合的序列组品种内差异也会相应增大; *rbcL*与*matK*序列品种间及品种内变异都不显著, 不适于区分山葡萄资源品种。

2.4 不同序列的品种间及品种内变异

我们利用Wilcoxon检验分析两两序列品种间及品种内的变异情况。结果(表5, 表6)表明, ITS2序列的品种间变异大于其它各序列, 且差异极显著, *rbcL*与*matK*序列差异不显著, 且极显著小于*psbA-trnH*与ITS2序列; 品种内变异方面, *psbA-trnH*与ITS2序列差异不显著, 且极显著大于*rbcL*和*matK*序列。此结果与单一序列比较结论相符。

2.5 不同序列Barcoding gap检验

Barcoding gap是指物种间DNA条形码序列的种间遗传变异明显大于种内变异, 并在两者之间形成一个明显的间隔区(Meyer and Paulay, 2005; Lahaye et al., 2008)。由图2 (X轴为K2P遗传距离, Y轴为在不同变异值时资源的分布情况)可知, *matK*序列的品种间和品种内变异重合(图2D), 不适合用于山葡萄资源的鉴定; *rbcL*序列正态分布图整体向品种内变异方向倾斜(图2C); *psbA-trnH*序列品种内变异差异和样本分布的比例明显较小, 而品种间的样本分布和变异差异明显较大, 有利于山葡萄资源的鉴定(图2B); ITS2序列品种内变异集中在barcoding gap图的左端(0.09–

0.15之间), 且品种间和品种内变异分别集中在barcoding gap图的两端, 没有明显的变异间隔区, 但正态分布图有偏向两端的趋势, 有利于山葡萄资源的鉴别(图2A)。

2.6 候选序列的鉴定效率评估

鉴于山葡萄资源中某些品种内的变异较大, 将已编辑的序列进行相似性搜索算法(BLAST)比对, 结果表明ITS2和*psbA-trnH*序列在品种间的鉴定成功率较高, *rbcL*和*matK*序列难以单独完成对山葡萄资源所有品种的鉴别。NJ聚类分析结果表明, 利用ITS2序列构建的系统发育树中, 不同资源品种间存在差异, 能够鉴定花性及遗传关系差异较大的资源品种(图3A)。利用*psbA-trnH*序列构建的系统发育树中, 不同资源品种间无明显的分辨率, 其中4N2与Shuangyou及73061与Shuangqing存在一定的差异(图3B)。利用*rbcL*序列构建的系统发育树中, 不同资源品种间的分辨率相对较高, 但其遗传距离值很小(图3C)。*matK*序列的鉴定效果优于*rbcL*序列, 其分辨率较高(图3D)。综合上述2种方法可知, 虽然*rbcL*和*matK*序列的分辨率相对较高, 但其扩增成功率和测序成功率均低于ITS2与*psbA-trnH*序列, 且不能对部分资源品种进行鉴定, 如考虑到全部资源的鉴定, 其真正的鉴定成功率会低于ITS2和*psbA-trnH*序列。因此, ITS2和*psbA-trnH*序列更适合作为山葡萄资源鉴定的条形码序列。

2.7 讨论

2.7.1 DNA条形码候选序列的筛选

理想的DNA条形码序列应具备种间变异大、种内变异小且扩增和测序成功率高等特点(Song et al., 2009; Yao et al., 2009)。本研究从5个DNA条形码序列(ITS、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*和*matK*)中筛选出比较适合山葡萄种质资源鉴定的候选序列, 即ITS2和*psbA-trnH*。其中ITS2序列较短, 易扩增, 且其能够与保守的5.8S和26S区段形成特定的颈环二级结构(Selig et al., 2008; Dassanayake et al., 2008; Keller et al., 2009), 使利用ITS2序列进行处理分析更加准确。辛天怡等(2012)选取羌活(*Notopterygium incisum*) 31份样品进行研究, 得出ITS/ITS2序列作为DNA条形码能稳定、准确鉴别羌活药材。刘震等(2010)对忍冬科(Caprifoliaceae) DNA条形码通用序列进行

表4 4个候选序列/序列组合的长度、GC含量及品种间和品种内差异

Table 4 Measures of inter-varieties and intra-varieties divergence locus length and average of GC content for 4 candidate barcodes/combination sequences

Potential barcode	Aligned length (bp)	Number of variable sites	Mean intra- distance	Mean inter- distance	Average of GC content (%)
ITS2	483	397	0.0015	0.1162	64.50
<i>matK</i>	896	44	0.0032	0.0110	35.40
<i>psbA-trnH</i>	422	238	0.0089	0.0921	27.50
<i>rbcL</i>	697	82	0.0068	0.0180	44.20
ITS2+ <i>matK</i>	1379	441	0.0024	0.0652	49.95
ITS2+ <i>psbA-trnH</i>	905	635	0.0058	0.0985	46.00
ITS2+ <i>rbcL</i>	1180	479	0.0045	0.0655	54.35
<i>matK</i> + <i>psbA-trnH</i>	1318	282	0.0064	0.0550	31.45
<i>matK</i> + <i>rbcL</i>	1543	126	0.0051	0.0220	41.35
<i>psbA-trnH</i> + <i>rbcL</i>	1119	320	0.0076	0.0560	39.80

表5 候选序列品种间差异的Wilcoxon检验

Table 5 Wilcoxon signes tests for inter-varieties divergences of candidate sequences

w+	w-	Inter relative ranks	<i>n</i>	<i>P</i> value	Result
ITS2	<i>rbcL</i>	w+=33035.00, w-=13630.00	319	0.000	<i>P</i> <0.01, ITS2> <i>rbcL</i>
ITS2	<i>matK</i>	w+=1444453.00, w-=0.00	577	0.000	<i>P</i> <0.01, ITS2> <i>matK</i>
ITS2	<i>psbA-trnH</i>	w+=11562.00, w-=8660.00	500	0.000	<i>P</i> <0.01, ITS2> <i>psbA-trnH</i>
<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	w+=8673.00, w-=6903.00	319	0.174	<i>P</i> >0.05, <i>rbcL</i> = <i>matK</i>
<i>rbcL</i>	<i>psbA-trnH</i>	w+=4350.00, w-=8720.00	620	0.000	<i>P</i> <0.01, <i>rbcL</i> < <i>psbA-trnH</i>
<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i>	w+=12556.00, w-=25330.00	422	0.000	<i>P</i> <0.01, <i>matK</i> < <i>psbA-trnH</i>

表6 候选序列品种内差异的Wilcoxon检验

Table 6 Wilcoxon signes tests for intra-varieties divergences of candidate sequences

w+	w-	Inter relative ranks	<i>n</i>	<i>P</i> value	Result
ITS2	<i>rbcL</i>	w+=39345.00, w-=18966.00	384	0.000	<i>P</i> <0.01, ITS2> <i>rbcL</i>
ITS2	<i>matK</i>	w+=142845.00, w-=0.00	577	0.000	<i>P</i> <0.01, ITS2> <i>matK</i>
ITS2	<i>psbA-trnH</i>	w+=17550.00, w-=18326.00	366	0.056	<i>P</i> >0.05, ITS2= <i>psbA-trnH</i>
<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	w+=11952.00, w-=5253.00	384	0.000	<i>P</i> <0.01, <i>rbcL</i> > <i>matK</i>
<i>rbcL</i>	<i>psbA-trnH</i>	w+=5968.00, w-=13589.00	469	0.000	<i>P</i> <0.01, <i>rbcL</i> < <i>psbA-trnH</i>
<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i>	w+=3985.00, w-=12578.00	580	0.000	<i>P</i> <0.01, <i>matK</i> < <i>psbA-trnH</i>

筛选,发现ITS2序列能够准确鉴别忍冬(*Lonicera japonica*)、接骨草(*Sambucus chinensis*)、濒危植物猥实(*Kolkwitzia amabilis*)以及七子花(*Heptacodium miconioides*)等。任阳阳等(2016)在鉴定虾脊兰属(*Calanthe*)植物时指出, ITS2和*matK*序列可以作为虾脊兰属部分植物的鉴定序列。东秀珠等(2000)在分析细菌的系统发育关系时,提出GC含量也是判断亲缘关系远近的一项重要指标。本研究结果表明,核基因ITS2序列在鉴定山葡萄资源中扩增效果和测序成

功率均较高, GC含量最高,表现出较大的品种间变异和较小的品种内变异,物种鉴定成功率较高,尤其在变异较大的资源中,可以检测系统发生和亲缘关系的远近,但对于差异较小的资源鉴定有一定的局限性。故在5个候选序列中,推荐ITS2序列作为山葡萄资源鉴定的DNA条形码序列。

在本研究中, ITS序列PCR扩增成功率和测序成功率都很低,出现多带情况,无法用其进行山葡萄资源的鉴定。然而*psbA-trnH*序列在山葡萄资源中具有

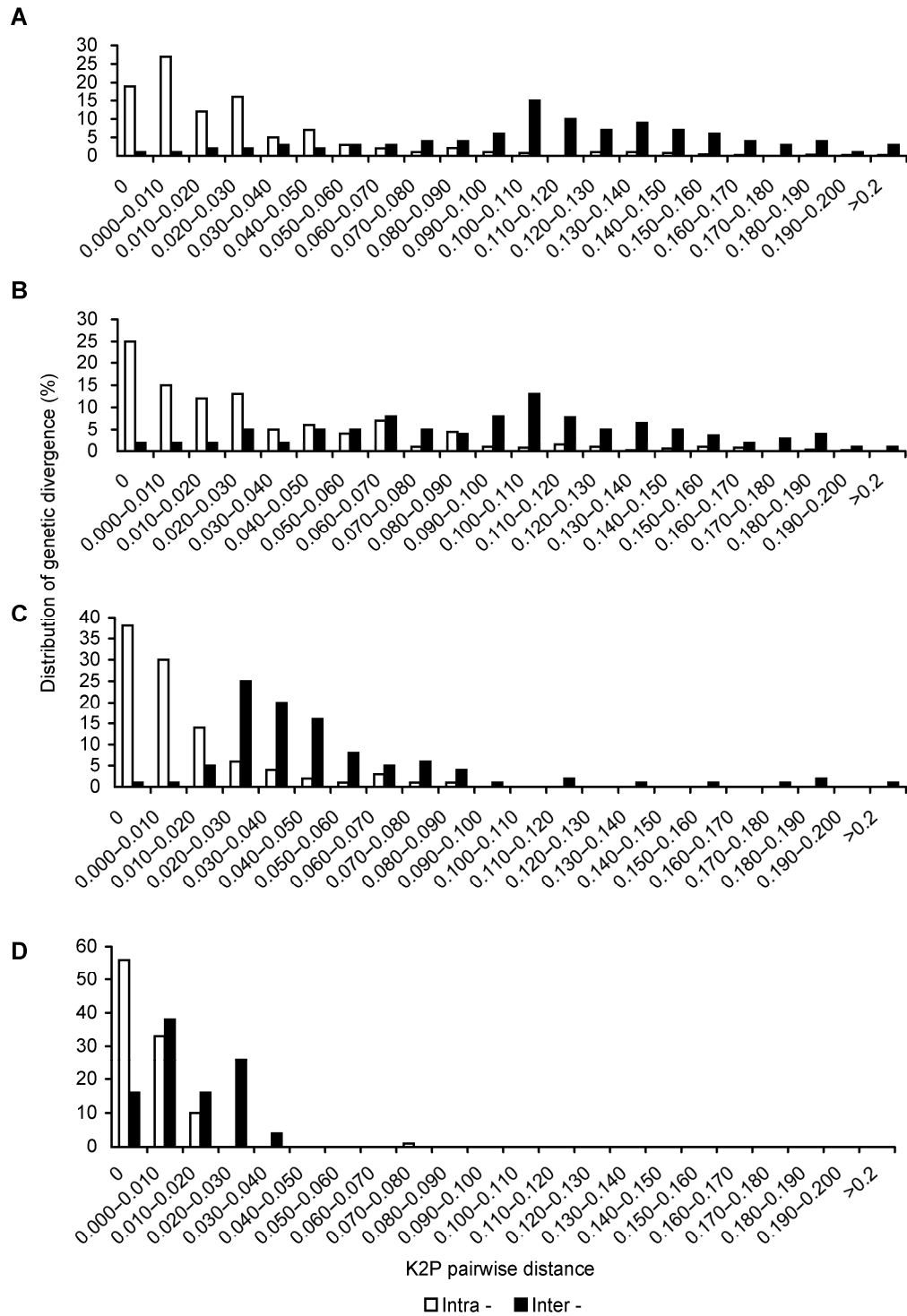


图2 山葡萄品种间和品种内变异barcoding gap图
(A) ITS2序列; (B) *psbA-trnH*序列; (C) *rbcL*序列; (D) *matK*序列

Figure 2 Distribution for intra- and inter-varieties variation of *Vitis amurensis*
(A) ITS2 sequence; (B) *psbA-trnH* sequence; (C) *rbcL* sequence; (D) *matK* sequence

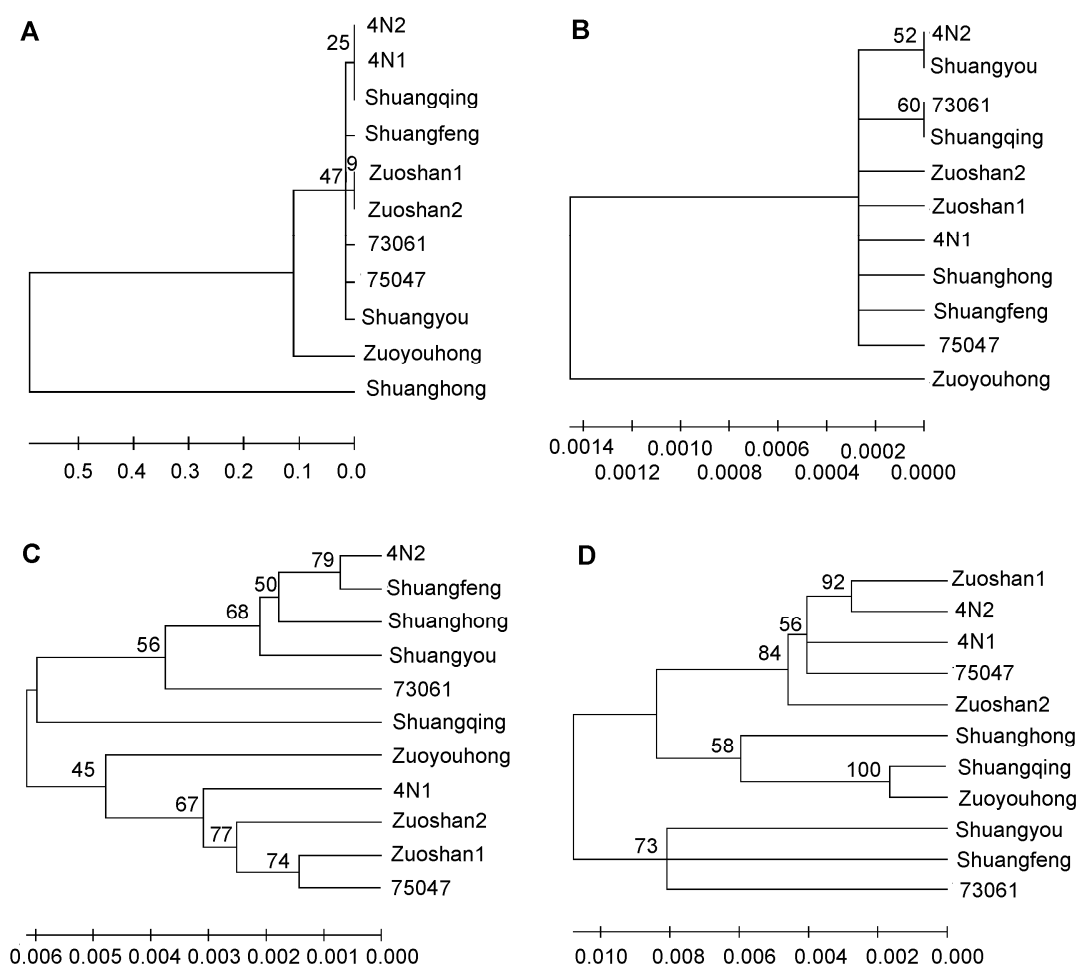


图3 利用不同序列构建的11份山葡萄资源品种系统进化树
(A) ITS2序列; (B) *psbA-trnH*序列; (C) *rbcL*序列; (D) *matK*序列

Figure 3 Neighbor-joining (NJ) tree for 11 varieties of *Vitis amurensis* by using different sequences
(A) ITS2 sequence; (B) *psbA-trnH* sequence; (C) *rbcL* sequence; (D) *matK* sequence

较高的扩增效率、测序成功率和鉴定成功率, 品种间的变异大于ITS2序列, 能够对山葡萄遗传差异较近的资源进行鉴定。Yao等(2009)的实验结果表明, *psbA-trnH*序列通用性较好, 扩增成功率较高, 其两端存在的75 bp保守序列是叶绿体间隔区进化速率最快的序列(Kress et al., 2005; Fazekas et al., 2008; Yao et al., 2009)。王柯等(2011)对锦葵科14个种26份样品进行分析, 发现*psbA-trnH*序列在属级水平上鉴定成功率为96.4%。石志刚等(2016)对宁夏枸杞(*Lycium chinense*)主要品种*psbA-trnH*序列的DNA条形码作了初步研究。高健等(2015)对鸡爪槭(*Acer palmatum*)

的8个分类群共32个个体进行DNA条形码分析, 认为*rpl16+psbA-trnH+trnL-trnF*片段组合较适合作为鸡爪槭种下分类群鉴定的DNA条形码序列。我们初步认为*psbA-trnH*序列能够鉴定变异较小的山葡萄资源, 同时弥补了ITS2序列在山葡萄资源鉴定中的不足。目前, 在植物界还未筛选出一个能够鉴定所有物种的理想引物序列。ITS2和*psbA-trnH*序列在山葡萄资源鉴定中各有优势。因此, 我们建议将ITS2和*psbA-trnH*序列联合作为山葡萄种质资源鉴定的候选序列。

*rbcL*序列易扩增且容易比对, 但其在研究中多集中在种级以上的水平, 物种鉴定表现不明显(Kress

and Erickson, 2007; Lahaye et al., 2008; Newmaster et al., 2008)。在山葡萄资源鉴定中, 我们发现 *rbcL* 序列在品种间和品种内差异均较小, 不适合作为山葡萄资源鉴定的DNA条形码序列。

matK 序列较其它编码区序列进化速率快, 但在不同植物的鉴定中表现不一致(Chase et al., 2007; Hollingsworth, 2008)。在对山葡萄资源鉴定中, *matK* 序列的品种间变异较小, 但其鉴定成功率较高, 综合比较发现其对山葡萄种质的鉴定成功率仅次于ITS2和*psbA-trnH*序列。

2.7.2 DNA条形码技术在山葡萄种质资源鉴定中的应用

DNA条形码技术的优势是序列短、易扩增、变异明显且操作简便, 提高了物种鉴定的效率和准确性。自DNA条形码技术应用于植物界以来, 通用序列的筛选就成为难点之一。山葡萄性状变异大、类型多、生命周期长、遗传背景复杂, 属于多基因杂合体, 培育优质、丰产且抗逆性强的山葡萄新品种是目前国际上葡萄育种的重要方向。山葡萄资源中自然杂交种多, 已审定的品种是通过种内杂交后代选育出来或是利用授粉方式杂交选育的。在实际生产中, 很难对一些品种或亲本进行准确判断。本研究对DNA条形码技术在山葡萄资源中的应用作了初步探索, 选取山葡萄资源中具有代表性的11份资源33个样本, 从5个候选序列筛选得出ITS2和*psbA-trnH*较适合作为山葡萄资源鉴定的序列, 能够为山葡萄资源的分类鉴定、亲缘关系分析、体细胞杂种鉴定、遗传图谱构建、基因定位以及育种材料的早期选择等提供科学依据。我们相信DNA条形码技术将成为山葡萄资源鉴定的一项有力工具。

参考文献

陈士林, 姚辉, 韩建萍, 辛天怡, 庞晓慧, 石林春, 罗焜, 宋经元, 侯典云, 石上梅, 钱忠直 (2013). 中药材DNA条形码分子鉴定指导原则. 中国中药杂志 **38**, 141–148.

东秀珠, 沈德龙, 辛玉华 (2000). 16S rDNA同源性所揭示的双歧杆菌与有关细菌的亲缘关系. 生物多样性 **8**, 146–152.

高健, 孟婉姮, 杜芳, 李俊清 (2015). 鸡爪槭种下分类群的DNA条形码筛选. 植物科学学报 **33**, 734–743.

李晓艳, 杨义明, 范书田, 王振兴, 艾军, 沈育杰 (2014). 山

葡萄种质资源收集、保存、评价与利用研究进展. 河北林业科技 (5–6), 115–121.

刘震, 陈科力, 罗焜, 潘宏林, 陈士林 (2010). 忍冬科药用植物DNA条形码通用序列的筛选. 中国中药杂志 **35**, 2527–2532.

任保青, 陈之端 (2010). 植物DNA条形码技术. 植物学报 **45**, 1–12.

任阳阳, 张梦婷, 张嘉丽, 樊佳佳, 张晓存, 王俊, 刘霞 (2016). 虾脊兰属植物DNA条形码的确立. 世界中医药 **11**, 2425–2429.

沈育杰, 赵淑兰, 杨义明, 李晓红, 宋润刚, 路文鹏 (2006). 我国山葡萄种质资源研究与利用现状. 特产研究 **28**(3), 53–57.

石志刚, 万如, 李彦龙, 王亚军, 马婷慧 (2016). 宁夏枸杞主要品种*psbA-trnH*的DNA条形码鉴定的初步研究. 农业科技与装备 (6), 1–2, 7.

宋润刚, 艾军, 李晓红, 杨义明, 沈育杰 (2009). 中国山葡萄产业的发展及对策. 中外葡萄与葡萄酒 (11), 64–69.

王柯, 陈科力, 刘震, 陈士林 (2011). 锦葵科植物DNA条形码通用序列的筛选. 植物学报 **46**, 276–284.

辛天怡, 姚辉, 罗焜, 向丽, 马晓冲, 韩建萍, 林余霖, 宋经元, 陈士林 (2012). 羌活药材ITS/ITS2条形码鉴定及其稳定性与准确性研究. 药学报 **47**, 1098–1105.

CBOL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12794–12797.

Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jørgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L, Wilkinson M (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* **56**, 295–299.

Chen SL, Yao H, Han JP, Liu C, Song JY, Shi LC, Zhu YJ, Ma XY, Gao T, Pang XH, Luo K, Li Y, Li XW, Jia XC, Lin YL, Leon C (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* **5**, e8613.

China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 19641–19646.

- Dassanayake RS, Gunawardene YINS, De Silva BDDNK** (2008). ITS-2 secondary structures and phylogeny of *Anopheles culicifacies* species. *Bioinformation* **2**, 456–460.
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SCH** (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One* **3**, e2802.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Roy Soc B Biol Sci* **270**, 313–321.
- Hollingsworth PM** (2008). DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: progress and outstanding questions. *Hereditas* **101**, 1–2.
- Kress WJ, Erickson DL** (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One* **2**, e508.
- Keller A, Schleicher T, Schultz J, Müller T, Dandekar T, Wolf M** (2009). 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene* **430**, 50–57.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH** (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 8369–8374.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V** (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 2923–2928.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948.
- Meyer CP, Paulay G** (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol* **3**, e422.
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, Janovec J** (2008). Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Mol Ecol Res* **8**, 480–490.
- Ross HA, Murugan S, Li WLS** (2008). Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Syst Biol* **57**, 216–230.
- Selig C, Wolf M, Müller T, Dandekar T, Schultz J** (2008). The ITS2 Database II: homology modelling RNA structure for molecular systematics. *Nucleic Acids Res* **36**, D377–D380.
- Slabbinck B, Dawyndt P, Martens M, De Vos P, De Baets B** (2008). Taxon gap: a visualization tool for intra- and inter-species variation among individual biomarkers. *Bioinformatics* **24**, 866–867.
- Song JY, Yao H, Li Y, Li XW, Lin YL, Liu C, Han JP, Xie CX, Chen SL** (2009). Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique. *J Ethnopharmacol* **124**, 434–439.
- Vinitha MR, Kumar US, Aishwarya K, Sabu M, Thomas G** (2014). Prospects for discriminating Zingiberaceae species in India using DNA barcodes. *J Integr Plant Biol* **56**, 760–773.
- Yao H, Song JY, Ma XY, Liu C, Li Y, Xu HX, Han JP, Duan LS, Chen SL** (2009). Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region. *Planta Med* **75**, 667–669.

Screening of Universal DNA Barcodes for *Vitis amurensis*

Huifang Song, Haishuang Liu, Yiming Yang, Shutian Fan, Changyu Li*, Jun Ai*

Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

Abstract To determine the best candidate sequence that can be used as a universal DNA barcode to identify *Vitis amurensis* varieties, we used PCR amplification with the ideal annealing temperature and sequenced the DNA fragments of five different regions (ITS, ITS2, *psbA-trnH*, *rbcL* and *matK*) of Amur grape samples. The effective sequence ratios obtained by PCR amplification and sequencing, divergence of intra- and inter-varieties, DNA barcoding gap and identification by using BLAST and NJ tree methods were used to evaluate the discrimination ability of these candidate sequences. ITS2 and *psbA-trnH* had fairly high amplification efficiency and sequencing efficiency in 33 samples belonging to 11 *V. amurensis* resources; they had larger divergences of intra- and inter-varieties and better DNA barcoding gaps than the other regions tested (ITS, *rbcL* and *matK*). In addition, ITS2 could discriminate some varieties that could not be successfully discriminated by the *psbA-trnH* region. ITS2 and *psbA-trnH* may be promising DNA barcode region combinations for identifying *V. amurensis* resources. DNA barcoding can compensate for morphological identification and help in the exact identification of *V. amurensis* resources.

Key words *Vitis amurensis*, DNA barcode, identification, ITS2, *psbA-trnH*, sequence

Song HF, Liu HS, Yang YM, Fan ST, Li CY, Ai J (2017). Screening of universal DNA barcodes for *Vitis amurensis*. *Chin Bull Bot* **52**, 723–732.

* Authors for correspondence. E-mail: lcy_lcy2002@163.com; aijun1005@163.com