

桂花品种群鉴定及其亲缘关系¹⁾

汪小飞 段一凡 王贤荣 左美银 李雪霞 夏 涛 向其柏 赵昌恒

(黄山学院, 黄山 242700)

(南京林业大学)

(黄山学院)

摘要 利用3对叶绿体基因片段(*psbJ-petA* *psbA-trnH* 和 *trnS-G*)和1对线粒体基因片段(*nad7* 内含子2)对桂花品种群进行了初步研究,结果表明:4对基因片段都有一定的分辨率,其中 *trnS-G* 和 *nad7* 内含子2 具有较多的信息位点,有潜力成为桂花种下等级鉴定的DNA条形码;桂花与其近缘种的分子系统树结果与经典分类基本一致,支持木犀属各组的划分;桂花品种起源很可能存在种间或种内的基因交流,不是单物种起源,这或许与桂花雄全异株的繁育系统有关。

关键词 桂花; 品种群; 基因片段; DNA 条形码

分类号 S685.13; S718.46

Identification and Relationships of *Osmanthus fragrans* Cultivar Groups/Wang Xiaofei(Huangshan University, Huangshan 242700, P. R. China); Duan Yifan, Wang Xianrong, Zuo Meiyin, Li Xuexia, Xia Tao, Xiang Qibai(Nanjing Forestry University); Zhao Changheng(Huangshan University) //Journal of Northeast Forestry University. -2013 41(7). -71~74

We used three informative chloroplast regions (*psbJ-petA*, *psbA-trnH* and *trnS-G*) and one mitochondrial region (*nad7* intron2) for the identification and relationships of *Osmanthus fragrans* cultivar groups. Four pairs of genes are potential to become DNA barcoding of *O. fragrans* groups for their discriminabilities, especially *trnS-G* and *nad7* intron 2. The phylogenetic results are mainly consistent with the classification of *Osmanthus*, in agreement with the section divisions of *Osmanthus*. There is gene exchange within *O. fragrans* groups or among *Osmanthus* rather than single origin of *O. fragrans* cultivars due to the androdioecy mating system of *O. fragrans*.

Keywords *Osmanthus fragrans*; Cultivar group; Gene segment; DNA barcoding

桂花(*Osmanthus fragrans* Lour.)作为传统十大名花之一,在我国已有2500多年的栽培历史。在长期栽培中,桂花形成了丰富的品种,分属于四季桂(*O. fragrans* Asiaticus Group)、银桂(*O. fragrans* Albus Group)、金桂(*O. fragrans* Letus Group)和丹桂(*O. fragrans* Aurantiacus Group)等不同的品种群^[1]。桂花品种和品种群的研究对于新品种繁育和优良种质资源开发具有重要意义,也一直是研究的热点^[2-13]。但由于方法和材料等原因,前人对桂花品种栽培起源及品种群关系研究还存在不少疑问^[14-16]。而且,目前桂花品种群和品种的鉴定大多还以形态特征为主,分辨率高、通用性强的分子手段还鲜有报道。

DNA条形码是利用一个或少数几个DNA片段对地球上现有物种进行识别和鉴定的一项新技术,是近年来进展最迅速的学科前沿之一^[17]。在植物条形码研究中主要是对物种以上水平进行鉴定,缺少种间及种下分类群的鉴定。而目前物种研究的热点之一在种内和种间遗传差异的限定,所以对于种

下分类群的分子鉴定也具有重要意义。在对植物的条形码技术研究中,一般选用的片段多为叶绿体基因的内含子区域,为了增加分辨率,往往会选用几个叶绿体基因片段^[18-19]。线粒体基因片段由于进化速率较慢,分辨率显得不足,但是也有一些特例,如nad家族的基因内含子区域在一些物种中显示出了较好的分辨率^[20]。利用两种不同遗传体系的基因片段对特定物种进行鉴定,可能会增加片段的分辨率以及准确性。

本研究拟采用两种单亲遗传基因内含子区域(叶绿体基因片段、线粒体基因片段)对桂花品种群进行初步分析,以期对桂花品种群的鉴定、相互关系以及品种栽培起源研究提供新的分子证据。

1 材料与方法

本研究用的桂花品种以及产地如表1所示,选择了桂花4个桂花品种群中具有代表性的品种,各选2份材料,及2个与桂花近缘的材料作为外类群进行测序。前人研究中已涉及的其他6种木犀属植物(北美木犀(*O. americanus*)、小叶月桂(*O. minor*)、山桂花(*O. delavayi*)、香花木犀(*O. suavis*)、齿叶木犀(*O. fortunei*)和华东木犀(*O. cooperi*))的同一引物测序结果也一并进行分析^[16,21]。

1) 江苏省自然科学基金资助项目(BK2005133)、黄山学院自然科学研究项目(2004ykj011)。

第一作者简介:汪小飞,男,1974年4月生,黄山学院生命与环境科学学院副教授。

收稿日期:2013年3月12日。

责任编辑:任 俐。

表1 试验材料信息

编号	名称	品种群	采集地
1	'Sijigui'	Asiaticus Group	江苏南京
2	'Xiaoye Fodingzhu'	Asiaticus Group	四川成都
3	'Boye Yin'	Albus Group	湖北咸宁
4	'Zi Yingui'	Albus Group	浙江金华
5	'Boye Jingui'	Letus Group	江苏南京
6	'Xiaoye Zijin'	Letus Group	四川成都
7	'Zuiji Hong'	Aurantiacus Group	浙江金华
8	'Zi Dangui'	Aurantiacus Group	江苏南京
9	<i>O. matsumuranus</i>	Outgroup	浙江金华
10	<i>O. heterophyllum</i>	Outgroup	江苏南京

经过预试验,本研究从10对引物中筛选出4对用于试验,具体引物信息见表2。DNA提取采用张博等^[24]的CTAB-硅珠法,稍作改进。用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,最终用TE稀释至20 mg·L⁻¹左右。扩增反应体系与扩增程序参照前人研究进行^[16 21-23]。PCR扩增产物送至上海美吉生物公司,切胶回收后,进行Sanger双脱氧测序。测序得到的双向序列利用ContigExpress进行组装和校对,再利用BioEdit7.1.3^[25]对多条序列进行比对,明显的排列错误利用手工调整予以修正;比对好的序列用DAMBE软件以NEX格式输出^[26];再用PAUP4b10进行分析。PAUP分析中,碱基处理作Fitch性状(无序),对于由序列长度多态性所造成的空位作为缺失状态分析。MP法采用启发式寻找、树二等分再连接(Tree-Bisection-Reconnect-On, TBR)构树方法,Bootstrap1000重复取样检验。

表2 引物信息

序号	片段名称	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	参考文献
1	<i>psbJ-petA</i>	F: ATAGGTACTGTARCYGGTATT R: AACARTTYGARAAGGTTCAATT	50	Guo et al. ^[16]
2	<i>psbA-trnH</i>	F: GTTATGCATGAACGTAATGCTC R: CGCGCATGGTGGATTCAACAATC	52	Yuan et al. ^[21]
3	<i>trnS-G</i>	F: GCCGCTT TAGT CCACT CAGC R: GAACGAAT CACACT TT TACCAC	54	严容等 ^[22]
4	<i>nad7</i> 内含子2	F: GCTTTACCTTATCTCTGATCG R: TGTCTCTGGCCATCATAGA	55	邓科君等 ^[23]

2 结果与分析

2.1 总DNA提取结果

CTAB-硅珠法是提取桂花总DNA的有效方法^[27]。笔者采用此法提取试验材料总DNA,经紫外分光光度计检测,各样品的D260/D280比值均为1.6~1.8,这说明DNA纯度很高(图1)。

2.2 PCR扩增与测序结果分析

经过筛选的4对引物在所有的试验材料中都有良好的扩增,图2为引物*psbJ-petA*和*nad7*内含子2在1~10号样品中的扩增效果。

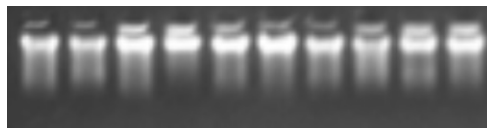
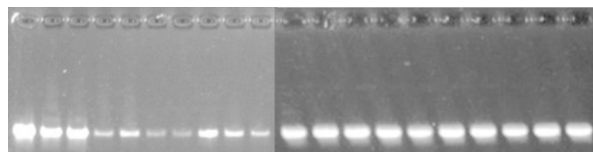


图1 CTAB-硅珠法提取的试验材料的总DNA

图2 引物*psbJ-petA*和*nad7*内含子2的PCR产物扩增图

测序结果经过比对之后发现,桂花的不同品种群之间变异位点总体较少,多数变异来自单碱基的替换或缺失(图3)。其中引物*nad7*内含子2排序后总长1378 bp,品种群中变异位点36个,信息位点20个;引物*psbA-trnH*排序后总长472 bp,品种群中变异位点6个,信息位点5个;引物*trnS-G*排序后总长1432 bp,品种群中变异位点53个,信息位点32个;引物*psbJ-petA*排序后总长890 bp,品种群中变异位点11个,信息位点10个。在不同的品种群之间存在特异性的碱基变化,如图4中,引物*psbA-trnH*序列比对后第338位点的位置,丹桂品种群存在特有的一个A碱基的缺失;图5中,引物*psbJ-petA*序列比对后的第153 bp的位置有一个C碱基的替换,这种特异性的位点变化对品种群的鉴定具有重要意义,很有可能成为桂花种下等级鉴定的DNA条形码。

另外,在不同品种群之间还发现有多碱基片段的缺失或插入,如图6中,引物*trnS-G*序列比对结果的第908-912 bp。这种呈片段的变异多见于种间或种上等级,在不同品种群之间出现这种情况对研究桂花品种起源具有重要意义,这可能与地质气候以及人类对不同品种的栽培选育有关。

2.3 品种群亲缘关系分析

利用本研究所得的序列信息,综合前人研究结果^[16 21],采用最大简约法(Maximum Parsimony, MP)构建了桂花及其近缘种的系统树(一致性指数(C_i)=0.916;保持指数(R_i)=0.768)(图7)。由图7可以看出,桂花的4个品种群并没有单独聚成一支,而是和华东木犀(*O. cooperi*)聚在了一起;3个秋季开花的品种群,银桂品种群、金桂品种群和丹桂品种群也没有聚在一起,而是四季桂和丹桂聚在了一起,这和前人的经典分类和分子标记研究结果不太一致^[1, 15],但和Guo et al. ^[16]的研究结果一致。作为对照种的牛矢果(*O. matsumuranus*)、北美木犀(*O. americanus*)和小叶月桂(*O. minor*)聚在了一起,得到了完全的支持($B_s=100\%$),显示木犀属圆锥花序

组植物高度的同源性。香花木犀组的山桂花(*O. delavayi*)和香花木犀(*O. suavis*)聚在了支持度较高的一支上($B_s=80\%$),而桂花所在的木犀组的柃树

(*O. heterophyllus*)、齿叶木犀(*O. ×fortunei*)和华东木犀(*O. cooperi*)共同处于一个分支上($B_s=68\%$)。

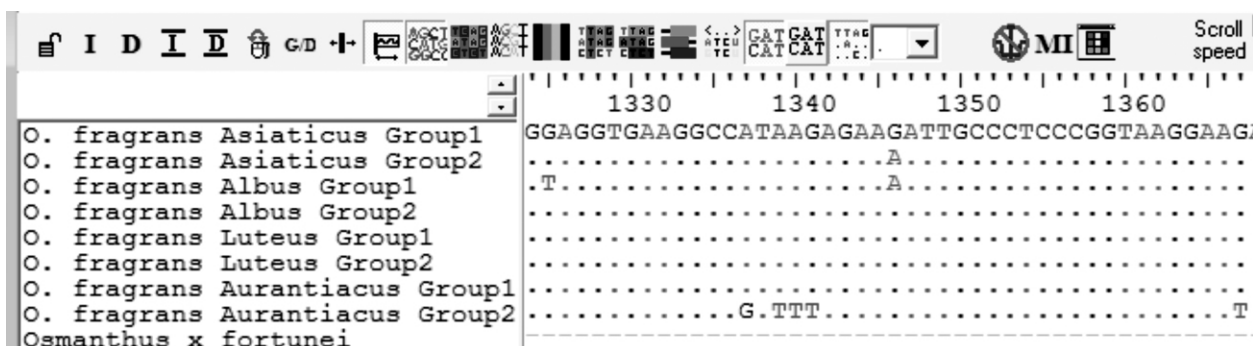


图3 *nad7* 内含子2序列比对结果

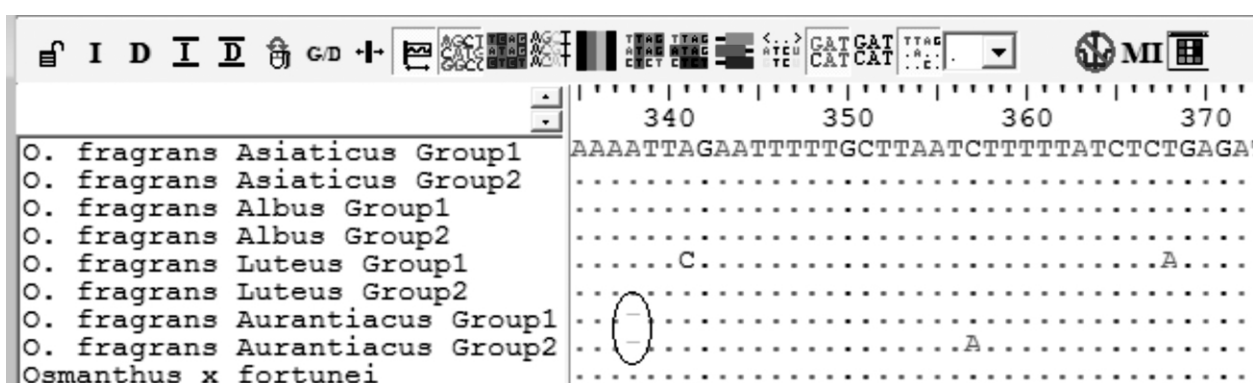


图4 *psbA-trnH* 序列比对结果

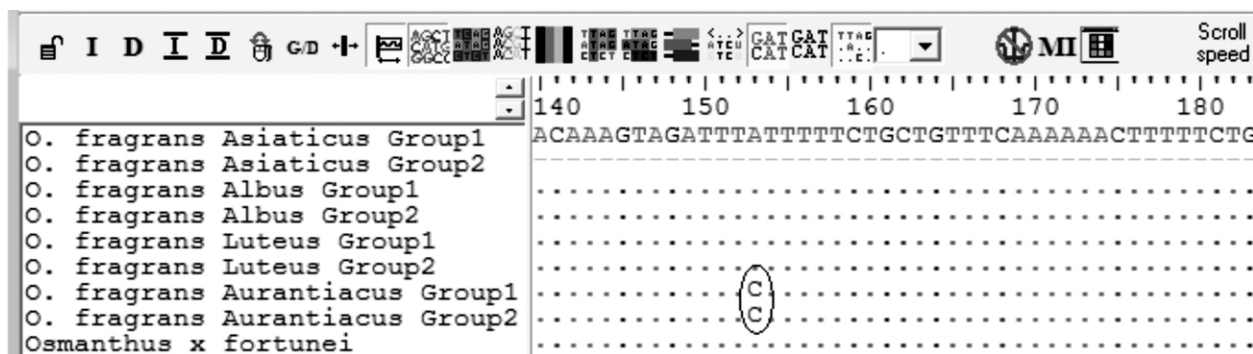


图5 *psbJ-petA* 序列比对结果

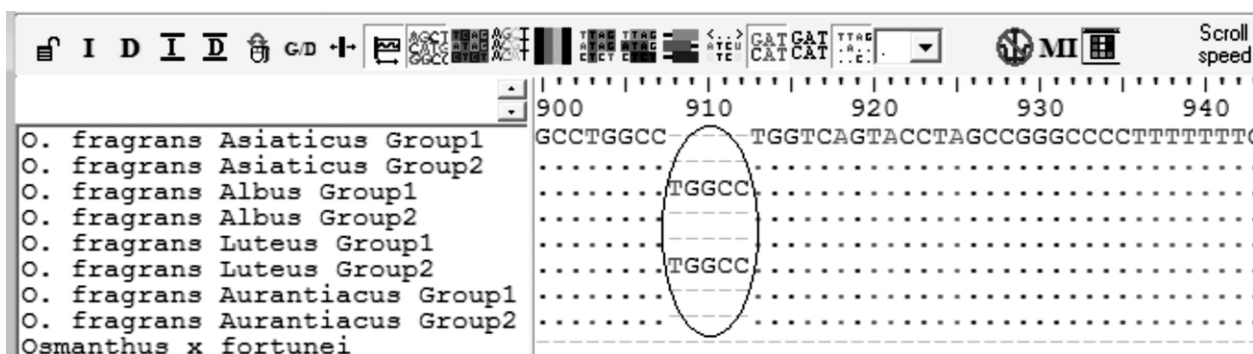
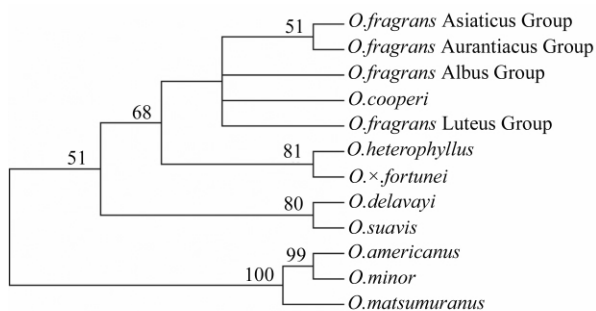


图6 *trnS-G* 序列比对结果



系统树枝上面的数字表示 MP 算法中大于 50% 的自展检验支持率 (B_s)。

图7 桂花及其近缘种的 MP 树

3 结论与讨论

栽培植物品种和品种群的分子鉴定和亲缘关系研究对于植物新品种开发和知识产权保护等都具有重要意义。本研究利用 3 对叶绿体基因片段 (*psbJ-petA* *psbA-trnH* 和 *trnS-G*) 和 1 对线粒体基因片段 (*nad7* 内含子 2) 对桂花品种群进行了初步研究, 结果表明 4 对基因片段都表现出一定的分辨率, 其中 *trnS-G* 和 *nad7* 内含子 2 具有较多的信息位点, 比对后发现不同品种群内有特异性的位点变异出现, 这对品种群的鉴定和桂花品种起源研究具有重要价值, 有潜力成为桂花种下等级鉴定的 DNA 条形码。

桂花与其近缘种的分子系统树结果与经典分类基本一致, 支持木犀属各组的划分^[1]。齿叶木犀 (*O. × fortunei*) 被认为是桂花和柃木 (*O. heterophyllus*) 的杂交种^[1], 本研究结果支持这种推断。桂花的 4 个品种群并没有单独聚成一支, 而是和华东木犀 (*O. cooperi*) 聚在了一起, 这表明二者亲缘关系十分接近, 也说明桂花品种起源很有可能存在种间的基因交流, 而不是单物种起源。研究表明桂花繁育系统为功能性的雄全异株^[28], 且其多个近缘种至少形态上也为雄全异株^[28-29], 这种独特的生殖系统可能蕴含着桂花及其近缘种存在广泛种间或种内杂交的潜力, 也或许能部分解释桂花品种起源的复杂性。但基于基因片段的分析结果与经典形分类以及分子标记的结果并不完全一致, 四季桂品种群作为一个与秋桂类形态差别明显的类群, 在本研究中与秋桂类没有区别开来, 这需要进行进一步的深入研究。

致谢: 感谢浙江金华华安园林苗木开发有限公司鲍志贤先生在采样过程中所给予的热情帮助!

参 考 文 献

- [1] 向其柏, 刘玉莲. 中国桂花品种图志 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2008: 18.
- [2] 陈建业, 宁玉霞, 赵翠华, 等. 河南桂花品种过氧化物酶同工酶研究 [J]. 园艺学报, 1995, 22(2): 176-180.
- [3] 赵小兰, 姚崇怀, 王彩云. 桂花品种的同工酶研究 [J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(6): 595-599.

- [4] 朱诚, 刘非燕. RAPD 技术与桂花品种分类和鉴定 [J]. 广西植物, 1999, 19(2): 190-192.
- [5] 殷玉亭, 刘军. 桂花 RAPD 分析的引物筛选 [J]. 四川农业大学学报, 2005, 23(2): 199-201.
- [6] 赵小兰, 姚崇怀. 桂花部分品种的 RAPD 分析 [J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(5): 484-486.
- [7] 伊艳杰, 黄莹, 尚富德. 利用 RAPD 标记研究桂林桂花品种间的亲缘关系 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(S): 65-70.
- [8] 尚富德, 伊艳杰, 张彤. 河南 17 个桂花品种的 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 685-687.
- [9] 邱英雄, 胡绍庆, 陈跃磊, 等. ISSR-PCR 技术在桂花品种分类研究中的应用 [J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 529-532.
- [10] 胡绍庆, 邱英雄, 吴光洪, 等. 桂花品种的 ISSR-PCR 分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(S): 71-75.
- [11] 李梅, 侯喜林, 单晓政, 等. 部分桂花品种亲缘关系及特有标记的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(4): 674-682.
- [12] 韩远记, 董美芳, 袁王俊, 等. 部分桂花栽培品种 AFLP 分析 [J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 137-142.
- [13] 李梅, 侯喜林, 郝日明. 桂花 SRAP-PCR 体系的确立及验证 [J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(2): 15-21.
- [14] 李梅. 桂花种质资源遗传多样性研究及品种鉴定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [15] Yuan Wangjun, Han Yuanji, Dong Meifang, et al. Assessment of genetic diversity and relationships among *Osmanthus fragrans* cultivars using AFLP markers [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2011, 14(1): 1-9.
- [16] Guo Suoqing, Xiong Min, Ji Chunfeng, et al. Molecular phylogenetic reconstruction of *Osmanthus* Lour. (Oleaceae) and related genera based on three chloroplast intergenic spacers [J]. Plant Systematics and Evolution, 2011, 294: 57-64.
- [17] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102: 8369-8374.
- [18] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. PloS One, 2007, 2(6): e508.
- [19] Kress W J, Erickson D L. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105: 2761-2762.
- [20] 郭亚龙, 葛颂. 线粒体 *nad1* 基因内含子在稻族系统学研究中的价值: 兼论 *Porteresia* 的系统位置 [J]. 植物分类学报, 2004, 42(4): 333-344.
- [21] Yuan Wangjun, Zhang Weirui, Han Yuanji, et al. Molecular phylogeny of *Osmanthus* (Oleaceae) based on non-coding chloroplast and nuclear ribosomal internal transcribed spacer regions [J]. Journal of Systematics and Evolution, 2010, 48(6): 482-489.
- [22] 严容, 张辉, 苏雪, 等. 棱果沙棘及其亲本 cpDNA *trnS-G* 片段的序列变异分析 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2009, 45(1): 94-97.
- [23] 邓科君, 杨足君, 刘成, 等. 红景天线粒体 *nad7* 基因内含子 2 序列测定及其系统发育意义 [J]. 遗传, 2007, 29(3): 371-375.
- [24] 张博, 张露, 诸葛强, 等. 一种高效的树木总 DNA 提取方法 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(1): 13-16.
- [25] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [26] Xia X, Xie Z. Dambe: software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. Journal of Heredity, 2001, 92: 371-373.
- [27] 段一凡, 王贤荣, 梁丽丽, 等. 古桂遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 福建林学院学报, 2011, 31(4): 335-339.
- [28] 郝日明, 赵宏波, 王金虎, 等. 野生桂花繁育系统的观察和研究 [J]. 植物资源和环境学报, 2011, 20(1): 17-24.
- [29] Green P S. A monographic revision of *Osmanthus* in East Asia and North America [J]. Notes Royal Botanic Garden Edinburgh, 1958, 22(5): 435-542.