

珍稀濒危植物 DNA 条形码研究进展

谢伟玲^{1,2}, 邹蓉², 杨雪³, 唐建民², 柴胜丰²

(1. 广西师范大学 生命科学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西壮族自治区中国科学院 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;
3. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530004)

摘要: DNA 条形码技术(DNA barcoding)是利用一段有足够变异的、较短的、易扩增的标准 DNA 片段对物种进行快速、准确的鉴定, 是近十年来分子生物学和分类学的研究热点。该文简述 DNA 条形码技术的标准、优势、分析方法, 主要综述了不同的单片段条形码及组合条形码在珍稀濒危植物中的研究现状, 并对 DNA 条形码技术在珍稀濒危植物中的应用前景进行了展望。

关键词: DNA 条形码技术; 物种鉴定; 珍稀濒危植物; 研究现状

中图分类号: Q 94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2015)04-0178-06

珍稀濒危植物是我国生物多样性的重要组成部分。近年来, 由于人口膨胀, 人类对自然资源的不合理利用和环境的迅速变化, 加之关键类群自身生物学特性瓶颈的限制, 使许多野生植物面临严重濒危, 甚至灭绝。据中科院院士洪德元估计, 中国的珍稀濒危植物约占高等植物总数的 15%, 大概有 4 000~4 500 种^[1]。珍稀濒危植物大多具有重要经济价值, 与人类关系十分密切, 但又非常脆弱, 备受人们关注。虽然我国保护珍稀濒危植物的工作已开展 30 多年, 但仍有许多核心问题亟待解决, 如珍稀濒危植物名单、物证材料的快速可靠鉴定、遗传多样性水平等。为了更好地保护珍稀濒危物种和生物多样性, 首先要对未知物种进行鉴定。DNA 条形码(DNA barcoding)技术是以一段标准 DNA 序列作为标记, 对物种实现快速、准确和自动化的鉴定方法, 类似于商品的条形码。该方法是近十年来迅速发展起来的物种鉴定新技术, 为解决传统分类学面临的难题提供了新方法^[2]。该文简述了 DNA 条形码技术及其发展概况, 着重论述了 DNA 条形码技术在珍稀濒危植物中的研究现状。

1 DNA 条形码的发展概况

1.1 DNA 条形码简介

DNA 条形码(DNA barcode)是指生物体内能够代

表该物种的、有足够变异的、易扩增且相对较短的标准 DNA 片段。DNA 条形码技术是近十年来新兴的一种可快速、准确地鉴定物种的 DNA 分类(DNA Taxonomy)方法, 旨在利用一段短的标准 DNA 片段对所有生物物种进行编码, 作为生物的通用身份证^[3-4]。2003 年, DNA 条形码概念首先由加拿大动物学家 Hebert 等^[5-6]提出, 并倡导将条形码技术应用到生物物种鉴定中。2004 年生物条形码联盟(Consortium for the Barcode of Life, CBOL)成立于华盛顿 Smithsonian 国家自然历史博物馆, 致力于开发生物条形码的全球标准和建立一个全面的条形码数据库, 至 2012 年为止完成了囊括鱼类和鸟类所有物种的条形码编码^[7]。生物条形码联盟于 2005 年 2 月在伦敦第一次, 2007 年 9 月在台北第二次以及 2009 年 11 月在墨西哥第三次召开了国际 DNA 条形码会议, 会议上各国成员对理想条形码的选择给予高度重视, 这推动了 DNA 条形码研究计划在全球的发展。该技术在动物研究中已得到广泛的应用, Hebert 等^[5-6]通过研究线粒体 COI 基因, 发现 COI 基因可以区分除刺胞动物门以外的所有动物门。DNA 条形码技术作为分子生物学和分类学发展的新方向, 可以广泛应用于保护和监测濒危物种、中草药资源鉴定、法医鉴定、生态学调查、药物等诸多领域^[8-9], 对保护生物学和生物多样性的研究具有重大意义。

1.2 DNA 条形码的标准和优势

DNA 条形码技术的核心内容是找到能区分各物种的序列片段, 即标准片段。理想的 DNA 条形码必须符合以下标准: 目标 DNA 片段应足够短(一般为 300~800 bp), 方便 DNA 提取和 PCR 扩增, 特别是扩增有部分降解的 DNA; 具有足够的变异以区分不同的物种, 同时具有相对保守序列; 含有高度保守区域, 以便于设计

第一作者简介: 谢伟玲(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: xwling_2025@163.com.

责任作者: 柴胜丰(1980-), 男, 湖南益阳人, 博士, 副研究员, 现主要从事植物保护生物学和药用植物栽培等研究工作。E-mail: sfchai@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260623); 广西植物研究所基本业务费资助项目(桂植业 12011)。

收稿日期: 2014-11-19

通用引物;目标 DNA 片段要包含足够的系统进化信息,以便确定物种在分类系统中的位置。

DNA 条形码技术与传统的分类方法及早期的分子标记技术相比,具有以下优点:待检样品不受个体外形特征的限制和发育状况的影响;DNA 条形码是基于基因水平上的鉴定方法,识别速度快且准确率高,可避免因外形相似而导致的鉴定错误,可加速隐种、新种的发现;DNA 条形码序列数据库是一个数字化的数据库,既弥补了形态描述的不足,又增加了识别的速度和鉴定的准确率,大大推进了分类学科的发展;操作简单,重复性好,结果可靠性强,不需要专业的分类学知识也可以完成物种的鉴定,大量节省人力和物力。

1.3 DNA 条形码主要分析方法

序列数据分析是探索 DNA 条形码最重要的一步。动物条形码所用的分析方法成熟而且比较简单,先是进行序列比对和人工校正,通过 MEGA 或 PAUP 软件计算种内和种间的 K2P 距离;再根据计算结果建立 NJ 树,然后根据 DNA 条形码遗传距离即可对未知标本进行鉴定和分类。当数据比较多时,还可以进行多元尺度分析,以图的形式更直观地反映物种水平的分辨效果^[5]。由于植物的种间杂交现象比较普遍,而且植物条形码的研究还处于评价阶段,所用的分析方法与动物相比有所不同,主要分析内容有以下几方面。

1.3.1 序列比对和人工校正 一般采用 Clustal W,生命条形码数据库中使用 Hidden Markov Models 进行序列比对^[9],还可用 BLAST search 在 Genbank 中搜索具有相似性的基因片段,比较片段的信息,即可知其可靠性。

1.3.2 遗传距离计算 目前,植物 DNA 条形码的研究还处于评价阶段,需要对各个片段的效果进行评估,因此需要对不同片段在种内和种间的变异情况进行比较,通常采用 Wilcoxon Signed Rank Tests 进行检验。种间距离通常采用 pairwise uncorrected p-distance 或 Kimura-2-parameter distance(K-2-P)模型计算。K-2-P 是距离值很小时的最佳模型,也是生物条形码联盟(CBOL)推荐使用的距离计算模型。种内距离通常采用 3 种参数表示:K-2-P 距离(K-2-P distance)、平均 θ 值和平均溯祖度(average coalescent depth)。

1.3.3 系统学分析 采用标准的分子系统学分析方法(如 NJ、UPGMA、ML、MP、Bayes)建立系统树,检验同一个物种的不同个体能否紧密地聚类在一起。Lahaye 等^[30]对以上几种系统树进行了比较,研究发现 MP 树和 UPGMA 树可以得到最高的物种正确识别率。但 MP 树所需运算时间过长,不一定适合计算大规模的数据。不同方法的运算时间、适用条件不同,在使用时应根据需要进行选择。

1.3.4 Barcoding gap 检验理想的条形码检测到的种

间遗传变异应明显大于种内遗传变异,并且会形成一个明显的间隔区,称作 Barcoding gap。Barcoding gap 是一个评价 DNA 条形码理想与否的重要指标,因此在各片段的评价阶段通常会进行 Barcoding gap 检验。Barcoding gap 检验是用柱形图呈现种间和种内的遗传距离的分布频率,在理想状态下,柱形图上的种间变异集中在数值较高的一侧,而种内变异则集中在数值较小的一侧。此外,可以用 Median 和 Wilcoxon Two-Sample Tests 来检测种内和种间变异的分布是否存在重叠。

2 DNA 条形码技术在珍稀濒危植物中的研究进展

DNA 条形码技术在动物分类中得到广泛的应用,但在植物中的研究进展比较慢。这是因为 COI 基因在植物中的进化速率远慢于在动物中的进化速率,故不适合作为大多数植物的编码基因。因此,近年来,探索有效的植物 DNA 条形码序列是国际生命条形码工作者的研究重点之一。叶绿体基因组是单亲遗传,避免了基因重组的影响,而且含有大量的保守序列和变异区域,便于通用引物的设计和物种区分。此外,在植物体内叶绿体含量高,即使 DNA 高度降解也容易提取和扩增。因此,植物 DNA 条形码的筛选倾向于叶绿体基因组^[10-12]。虽然叶绿体基因组具有很多优点,而且生物条形码联盟建议的植物条形码片段都出自叶绿体片段(如 rpoCl、matK、rpoB、nhdJ、YCF5、accD 等),但是有些植物的叶绿体基因组不适合作为条形码。例如:有的片段缺少通用的扩增引物(如 matK、psbK-psbI),有的片段则在某些植物类群中缺失(如在禾本科植物中缺失 accD,苔藓类植物中缺失 YCF5,在松属植物中缺失 ndhJ,ndhJ 在部分兰花中变短或功能丧失^[10]。因此,一些研究者们也建议了其它的片段。例如:Kress 等^[13]建议的 ITS 和 trnH-psbA 片段;Chase 等^[14]和 Kress 等^[15]建议的 rbcL 片段。目前,植物的潜在条形码片段主要在叶绿体基因组和核糖体内转录间隔区(Internal Transcribed Spacers,ITS)中筛选。而且随着越来越多的研究表明,单一片段不可能对所有的植物物种进行准确的鉴定,因此,研究者们逐渐提出了不同的片段组合方案,以提高物种分辨率。下面就几个在植物研究中具有代表性的片段及组合在珍稀濒危植物中的应用情况进行介绍。

2.1 单片段在珍稀濒危植物中的应用

2.1.1 ITS 核糖体内转录间隔区 ITS(18S-5.8S-26S)广泛存在于光合真核生物植物(除蕨类外)和真菌中,常用于区分种水平,是系统学研究中最常用的片段之一,在 Gen Bank 中有大量的数据。ITS 片段进化速率快,同源性比对也比较复杂,ITS1、ITS2 和 5.8S 序列差异较大,5.8S 最为保守,当 ITS 近缘性比对不易分辨或没有

匹配的情况下,可以通过比对 5.8S 片段限定比对范围^[16]。噶颂等^[17]对来自沙参属的 10 个种和作为外类群的风铃草属的 2 个种的 rDNA ITS 片段进行序列分析,证实并支持将裂叶沙参移出泡沙参复合体甚至移出有齿亚组的推论。刘艳玲等^[18]对睡莲属 11 个种和外类群中国莲的 nrDNA ITS 区进行了序列测定,结果表明, nrDNA ITS 区可以准确地对睡莲属植物进行分类及表示其种间的系统发育关系。Sass 等^[11]以裸子植物苏铁目植物为材料,比较核糖体 ITS 片段和 7 个叶绿体基因,结果表明 ITS 最适合作为苏铁目植物的条形码。陶晓瑜等^[19]用 ITS 序列阐明明党参和川明参的系统关系, ITS 序列系统发育分析结果支持明党参置于美味芹族的分类地位,提出将川明参置于美味芹族。蒋明等^[20]利用 rDNA ITS 序列对 10 种杓兰属植物进行分类,结果显示利用 rDNA ITS 序列可将 10 种杓兰属植物完全分开。崔占虎等^[21]利用 ITS 序列鉴定黄芪与其混伪品,结果表明利用 ITS 序列能够成功鉴定黄芪及其易混伪品,可以作为黄芪与其混伪品的分子鉴定方法。孙涛等^[22]采用国际通用的条形码序列 ITS2 对黄连属 3 个物种的 ITS2 序列进行测序分析,结果显示 ITS2 序列可将黄连属及其伪混品很好地区分开来,因此, ITS2 序列可用于鉴定黄连及其伪混品。杨春勇^[23]对白木香和云南沉香的 ITS2 序列进行分析,结果表明 ITS2 序列可以有效区分白木香和云南沉香。对石斛属植物的 ITS 区序列进行分析,结果显示 ITS 序列可以在分子水平对石斛的不同种质进行鉴别,可作为石斛属植物种间的分子鉴定标记^[24-28]。李家敏等^[29]对盘龙参的 rDNA ITS 序列进行分析,结果表明 rDNA ITS 序列可作为盘龙参的分子鉴定标记。虽然 ITS 经常用于系统学研究,但是在一些类群中不合作植物条形码,分析原因有:长序列的 Poly-A、Poly-C 和 Poly-G 的存在,导致测序和序列分析不易进行^[27];核基因组具有多拷贝的特性,在种内序列变异较大,降低了其应用性^[31];其长度变异大,扩增困难。因此,建议将 ITS 与其它候选序列组合使用。

2.1.2 matK matK 是叶绿体基因组蛋白编码基因中进化速率最快的基因之一,片段大小合适,种间差异度高以及碱基转换/颠换率较低。2009 年,生物条形码联盟植物工作组将 matK 推荐为植物条形码候选序列之一。Labaye 等^[30]以兰科植物为主要材料,对叶绿体中 8 个 DNA 片段进行比较,结果显示 matK 的扩增成功率和正确识别率均较高,因此推荐 matK 作为有花植物通用的条形码。章群^[31]分析杜仲原植物 matK 基因序列特征,结果显示杜仲原植物的 matK 基因具有足够的特异性变异位点,是杜仲原植物良好的分子标记。王亚玲等^[32]用木兰科 57 种植物的 matK 基因序列分析木兰属植物的系统发育关系,结果表明该方法是可行的。张伟

等^[33]对玫瑰、蔷薇、月季等易混的植物 matK 基因序列进行序列分析,结果表明 matK 序列能够提供足够的变异位点用于玫瑰、蔷薇、月季等易混植物的准确鉴定。matK 基因在一些分支类群中很难扩增和测序,引物通用性差^[34-35],在越来越多的研究中也得到了证实。Sass 等^[11]用生物条形码联盟植物工作组建议的 matK 引物扩增苏铁目植物,没有得到理想的扩增效果。徐凤霞^[36]对木兰属国产组和含笑属各组的 matK 序列进行测定分析,结果显示 matK 序列不能明确区分木兰属和含笑属。因此 matK 基因通用性引物的设计还有待研究。

2.1.3 rbcL rbcL 具有通用、易扩增、易比对的特点,是最早被应用于植物系统进化及分类研究中的基因片段之一,在 Gen Bank 中拥有大量的数据,因此,被建议作为植物的 DNA 条形码。宁静等^[37]通过分析 25 种石斛属植物的 rbcL 蛋白质序列,探讨石斛属植物的系统发育关系,结果与经典的表征分类结果基本一致,在分子水平上显示了石斛属植物间的亲缘关系。王凡红等^[38]从铁线蕨属鞭叶铁线蕨系选取 8 个种,以荷叶铁线蕨作为外类群,对其质体 rbcL 片段进行序列分析,结果表明, rbcL 片段可以为铁线蕨属发现的 3 个新种提供分子鉴定证据。但是 Kress 等^[16]认为 rbcL 进化速度较慢,不适合用于鉴定有花植物种水平上的物种。更多的研究发现, rbcL 不合作单独条形码,原因有: rbcL 片段的变异不够大,主要存在于种以上水平^[9,16,39]; rbcL 片段长度过长(大于 1 000 bp),测序困难^[16]。因此,研究者们建议将 rbcL 与另外的片段组合使用^[15]。

2.1.4 trnH-psbA trnH-psbA 间隔区是叶绿体基因进化速率最快的片段之一,片段两端含有 75 bp 的保守序列,便于设计通用引物^[40]。Kress 等^[16]认为 trnH-psbA 间隔区可以作为植物条形码片段之一。Kress 等^[15]和 Fazekas 等^[41]的研究结果都表明,与其它候选片段相比, trnH-psbA 的扩增成功率和物种鉴别率是最高的,而且用 trnH-psbA 区分近缘种时,效果也是最好的。此外, Lahaye 等^[30]的研究结果显示 trnH-psbA 对兰科植物的识别率高达 90% 以上。钱丹^[42]对黄芪原植物的 22 个居群的 cpDNA 基因间序列 trnH-psbA 进行分析,结果发现 trnH-psbA 序列可以作为鉴定黄芪原植物的分子鉴定标记。姚领爱等^[43]对铁皮石斛的 rbcL、trnH-psbA、rbl16 进行序列对比和聚类分析,发现 rbcL 基因可以将铁皮石斛和其混淆品进行有效的区分。但若是将 rbcL 基因作为石斛属植物的条形码基因仍需深入的研究。但 Sass 等^[11]用 Kress 等^[16]推荐的引物在苏铁目植物中进行扩增,结果除苏铁 *Cycas* 外均扩增出 2 个条带,表明 trnH-psbA 间隔区不适于作为苏铁目植物的条形码。trnH-psbA 间隔区由于普遍存在插入/缺失现象,导致在不同植物间其长度变异较大,非同属物种间比对困难。

此外,研究发现 trnH-psbA 片在某些类群中的识别率较低。因此,trnH-psbA 不能单独作为植物条形码使用,建议与其它的候选片段组合使用。

2.1.5 其它片段 其它片段如 trnL、rpoB、rpoC1、UPA、accD、YCF5、nhdJ 等,由于缺乏足够的试验证据或存在一定的不足而没有得到广泛关注。虽然 trnL 内含子及部分 P6 loop 片段的引物保守、容易扩增,但其最大的缺点是进化速率慢,在物种识别率较低^[34,44]。很多试验数据表明,rpoB 和 rpoC1 虽然容易扩增,但序列相对保守,变异较小。多数试验数据表明 UPA 片段在陆生植物中没有显著的变异,仅在海藻中存在一定的变异^[11,41,45]。禾本科植物中缺失 accD 序列,苔藓类植物中缺失 YCF5 序列,在松属植物中缺失 ndhJ,ndhJ 在部分兰花中变短或功能丧失^[10]。

2.2 多片段组合方案在珍稀濒危植物中的应用

很多试验研究结果表明,单片段的条形码识别率低,不能满足条形码的要求^[11,15,41,45]。而且,想找到一段可以鉴别所有植物物种的片段是很难的。因此,筛选植物 DNA 条形码时不仅要研究单个片段的鉴别效果,同时也可以考虑多片段组合的鉴别效果。目前在植物中研究较多的片段组合主要有以下 4 个。

2.2.1 ITS+trnH-psbA 片段组合的想法首先是由 Kress 提出的,Kress 等^[16]认为 ITS+trnH-psbA 将是被子植物最有应用价值的组合之一,但没给出具体的分析。Zuo 等^[46]从 11 个候选片段(atpF-atpH,psbA-trnH,psbK-psbI,psbM-trnD,matK,rps16,rpoB,rpoC1,rbcL,nad1,ITS)中筛选人参属的 DNA 条形码序列,结果显示 ITS 和 psbA-trnH 组合在种和簇的鉴定效果最好,建议将 ITS+psbA-trnH 作为鉴定人参属的条形码基因。但是,通过文献资料发现 ITS+psbA-trnH 组合在珍稀濒危植物中的应用较少。

2.2.2 rpoC1+rpoB+matK 和 rpoC1+matK+trnH-psbA rpoC1+rpoB+matK 或 rpoC1+matK+trnH-psbA 组合于 2007 年由 Chase 等提出,是由引物通用性好、扩增成功率高、进化较慢的编码基因(rpoC1 和 rpoB)和变异较大、进化较快的编码基因(matK)或高度变异、进化较快的非编码区(trnH-psbA)组成。这样的组合可以保证物种间进行广泛的比较以及识别更多的物种。但在一些研究中,这 2 个组合的识别效果并不理想^[11,41]。因此,需要更多的试验数据来检测、证实这 2 个组合的应用前景。

2.2.3 rbcL+trnH-psbA Kress 等^[15]将变异较小但通用性好的 rbcL-a 序列和高变异的 trnH-psbA 序列组合起来,结果显示 rbcL-a+trnH-psbA 的扩增效果、物种识别效果是最好的,物种的正确识别率也较高。该组合特别适用于鉴别被子植物中物种丰富的属。虽然 rbcL-a+trnH-psbA 组合在前人的研究中取得较好的效果,但

是杨春勇^[23]利用 rbcL-a+trnH-psbA 组合对白木香和云南沉香进行鉴别,结果显示白木香和云南沉香的 rbcL-a 和 trnH-psbA 片段没有差异,无法进行有效区分。因此,需要更多的试验数据来检测、证实该组合在珍稀濒危植物中的应用前景。

2.2.4 matK+atpF-atpH+psbK-psbI 和 matK+atpF-atpH+trnH-psbA 2007 年,Kim 等^[48]在第二届国际生物条形码大会上提出 matK+atpF-atpH+psbK-psbI 和 matK+atpF-atpH+trnH-psbA 组合。Lahaye 等^[47]对这 2 个片段组合进行了检测,结果显示这 2 个片段组合的扩增成功率和物种识别率都很高。但 Fazekas 等^[41]也检测了这 2 个片段组合,结果显示在苔藓和蕨类植物中扩增失败。因此,Fazekas 等^[41]对此给出建议:使用多片段组合时,编码片段在 rbcL、rpoB、matK 中选择,非编码片段在 trnH-psbA、atpF-atpH 中选择。

3 存在的问题及展望

DNA 条形码自 2003 年提出以来,得到很多生物学家的支持,但是也有部分专家和学者怀疑甚至反对。他们认为仅靠 1 个短的 DNA 片段就能鉴定物种,得到的结果不可靠,而且会对以形态为基础的分类方法造成不良的影响^[16]。目前,DNA 条形码在动物中的研究已日益成熟,但植物 DNA 条形码的研究相对落后,还处在 DNA 条形码的筛选和评价阶段。由于不同单片段和多片段组合在不同类群中的鉴别效果不同,目前还没找到标准的植物条形码片段。而且很难找到 1 个可以用来鉴定所有植物物种的理想片段。而多片段组合条形码在一定程度上不仅可以降低种内变异的影响,还可减少种内和种间变异的交叉影响^[9]。选择多片段组合时,应注意选择进化速率不同的片段和编码、非编码基因组合。在植物条形码的很多研究中,其研究对象只是每个物种的 1 或 2 个个体或是采自 1 个受限的地理区域内的样品,得到的试验结果不够准确,不能作为参考。而且,分析、计算植物 DNA 条形码的方法还有待提高。此外,发现前人推荐的 6 个植物条形码多片段组合在珍稀濒危植物中的应用很少。目前,DNA 条形码在珍稀濒危植物中研究较多的是单片段条形码,但得到的单片段条形码也仅限用于某些种或属的物种鉴定,具有一定的局限性。可见,珍稀濒危植物的 DNA 条形码还有待探究。尽管 DNA 条形码技术在植物中的研究仍存在很多问题,但相信随着生物科学技术的发展和应用以及生物学者们大量的探索研究、大规模的分析和整体评价,一定会找到合适的、通用的植物条形码。届时便可实际应用于保护珍稀濒危物种、鉴定中草药、法医鉴定、生态学调查、药物市场监管、识别外来入侵物种等诸多领域,对保护生物学和生物多样性的研究具有重大意义。可见,DNA 条形码技术具有光明、广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 丁佳. DNA 条形码: 为濒危植物撑起“保护伞”[N]. 中国科学报, 2013-12-26 (1).
- [2] 刘宇婧, 刘越, 黄耀江, 等. 植物 DNA 条形码技术的发展及应用[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(1): 74-82, 93.
- [3] 李虎, 戴仁怀, 李子忠. DNA 条形码编码技术及其在叶蝉科昆虫中的应用[J]. 山地农业生物学报, 2012, 31(5): 432-438.
- [4] 王鑫, 黄兵. DNA 条形码编码技术在动物分类中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2006(4): 67-72.
- [5] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Philosophical of Transactions of the Royal Society Biological Science, 2003, 270: 313-321.
- [6] Hebert P D N, Ratnasingham S, Dewaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B, 2003, 270: 96-99.
- [7] Marshall E. Will DNA bar codes breathe life into classification? [J]. Science, 2005, 307: 1037.
- [8] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术, 2007, 9(3): 7-1.
- [9] Newmaster S G, Fazekas A J, Ragupathy S. DNA barcoding in land plans evaluation of rbcL in a multigene tiered approach [J]. Canadian Journal of Botany, 2006, 84(3): 335-341.
- [10] 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.
- [11] Sass C, Little D P, Stevenson D W, et al. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of Cycads[J]. PLoS One, 2007, 2(11): e1154.
- [12] 柴华. 适用于地衣的 DNA 条形码片段的筛选[D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔大学, 2011.
- [13] Kress W J, Erickson D L. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(8): 2761-2762.
- [14] Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005, 360: 1889-1895.
- [15] 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.
- [16] 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, USA, 2005, 102: 8369-8374.
- [17] 噶颂, Schaal B A, 洪德元. 用核糖体 DNA 的 ITS 序列探讨裂叶沙参的系统位置——兼论 ITS 片段在沙参属系统学研中的价值[J]. 植物分类学报, 1997, 35(5): 385-395.
- [18] 刘艳玲, 徐立铭, 倪学明, 等. 基于 ITS 序列探讨睡莲属植物的系统发育[J]. 武汉大学学报(理学版), 2005, 51(2): 258-262.
- [19] 陶晓瑜, 桂先群, 傅承新, 等. 明党参和川明参种间遗传分化和系统关系的分子标记和 ITS 序列分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2008, 34(5): 473-481.
- [20] 蒋明, 李温平, 周晶, 等. 10 种肉桂属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析[J]. 浙江大学学报(理学版), 2012, 39(6): 689-695.
- [21] 崔占虎, 李越, 袁庆军, 等. 黄芪及其混伪品的 ITS 序列分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3773-3776.
- [22] 孙涛, 孔德英, 滕少娜, 等. 基于 ITS2 序列的黄连及其伪混品的分子鉴定[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(9): 20-22.
- [23] 杨春勇. 栽培石斛和白木香的遗传多样性分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [24] 刘静, 何涛, 淳泽. 基于 ITS 序列的中国药用石斛及其混伪品的分子鉴定[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2853-2856.
- [25] 黄海, 李劲松, 符岸军, 等. 石斛属植物 DNA 条形码序列的筛选[J]. 热带作物学报, 2010, 31(10): 1769-1777.
- [26] 顾慧芬, 庄意丽, 马子建, 等. 基于 ITS 序列分析铁皮石斛与近缘类群的亲缘关系[J]. 中成药, 2010, 32(4): 628-632.
- [27] 栗丹, 李振坚, 毛萍, 等. 基于 ITS 序列石斛材料的鉴定及系统进化分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1539-1550.
- [28] 邓瑞云, 张蕾, 邱道寿, 等. 药用石斛 rDNA ITS 序列分析[J]. 广东农业科学, 2013(8): 133-135.
- [29] 李家敏, 周秀玲, 姜琼. 濒危药用植物盘龙参 rDNA ITS 序列分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 30-33.
- [30] 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, USA, 2008, 105: 2923-2928.
- [31] 章群. 中药杜仲原植物的分子鉴定[J]. 生态科学, 2004, 23(2): 141-143.
- [32] 王亚玲, 李勇, 张寿洲, 等. 用 matK 序列分析探讨木兰属植物的系统发育关系[J]. 植物分类学报, 2006, 44(2): 135-147.
- [33] 张伟, 李永. 玫瑰、蔷薇、月季的 DNA 条形码鉴定[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 59, 62.
- [34] Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants[J]. Taxon, 2007, 56: 295-299.
- [35] Hollingsworth P M. DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: progress and outstanding questions [J]. Heredity, 2008, 101: 1-2.
- [36] 徐凤霞. 木兰族和含笑族的系统学关系——基于叶绿体 *matK* 基因序列分析[J]. 西北植物学报, 2003, 23(7): 1169-1172.
- [37] 宁静, 陈惠娟, 钟一文, 等. 基于 rbcL 蛋白质序列的石斛属植物系统发育研究[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版), 2011(4): 34-39.
- [38] 王凡红, 卢金梅, 李德铎. 铁线蕨属 3 个种的分布新记录[J]. 西北植物学报, 2014, 34(5): 1055-1060.
- [39] Wolf P G, Rowe C A, Sinclair R B, et al. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from a leptosporangiate fern, *Adiantum capillus-veneris* L[J]. DNA Research, 2003, 10(2): 59-65.
- [40] Shaw J, Lickey E B, Beck J T, et al. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 non-coding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis [J]. American Journal of Botany, 2005, 92(1): 142-166.
- [41] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. PLoS One, 2008, 3: e2802.
- [42] 钱丹. 黄芪原植物的鉴别研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2009.
- [43] 姚领爱, 胡之璧, 郑志仁, 等. 铁皮石斛种质资源研究中的 DNA 条形码初探[J]. 上海农业学报, 2012, 28(1): 49-54.
- [44] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. Power and limitations of the chloroplast trnL(UAA) intron for plant DNA barcoding[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35: e14.
- [45] Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A D, et al. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae[J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8: 480-490.
- [46] Zuo Y J, Chen Z J, Kondo K, et al. DNA barcoding of *Panax* species[J]. Planta Medica, 2011, 77: 182-187.

苦瓜强雌性系的研究进展

张景云¹, 万新建¹, 黄月琴², 胡新龙¹, 赵萍¹, 缪南生¹

(1. 江西省农业科学院 蔬菜花卉研究所, 江西 南昌 330200; 2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要:进入 21 世纪, 随着人们对苦瓜独特的营养保健功效的深入认识和现代药理学对苦瓜药用价值的新发现, 苦瓜越来越受到消费者的青睐, 需求量与日俱增, 这使得苦瓜育种材料的获得及新品种选育变得越来越重要。基于此, 现从苦瓜性别分化、强雌性系选育及应用、强雌性状的遗传分析及分子生物学研究等方面, 综述了苦瓜强雌性系的研究进展, 以期对苦瓜基础理论方面的研究提供参考。

关键词:苦瓜; 强雌性系; 研究进展

中图分类号:S 642.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0183-03

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 属葫芦科苦瓜属 (*Momordica*) 蔓性一年生植物, 起源于热带亚热带地区, 广泛分布于南美亚马逊、非洲、亚洲、加勒比地区等地^[1-2]。苦瓜性型表现为雌雄同株异花, 属异花授粉作

物, 自然条件下靠昆虫传粉, 致使单果种子数少, 繁殖系数低; 在选配普通杂种一代时, 母本雄花多、雌花少, 造成杂交制种去雄困难, 工作量增大且繁琐, 同时制种成本又比较高, 这些问题严重限制了苦瓜杂种优势的利用。苦瓜强雌性系的出现, 简化了制种程序, 降低了制种成本, 为提高苦瓜杂种优势的利用开辟了新的途径。现从苦瓜性别分化、强雌性系选育及育种、雌性系的遗传分析及其分子生物学研究等方面, 综述了苦瓜雌性系的研究进展, 以期对苦瓜科研工作提供参考。

1 苦瓜性别分化

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 在性别表现方面有其共性: 自然情况下, 雄花先于雌花发生, 在较低节位形

第一作者简介:张景云(1980-), 女, 博士, 助理研究员, 现主要从事蔬菜遗传育种及生物技术等研究工作。E-mail: zhangjingyun0108@126.com.

责任作者:缪南生(1956-), 男, 硕士, 研究员, 现主要从事蔬菜遗传育种及生物技术等研究工作。E-mail: jaasvfimiao@163.com.

基金项目:国家现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-25); 江西省科技支撑计划资助项目(20111BBF60048); 江西省农业科学院科技创新基金资助项目(2011cj002)。

收稿日期:2014-11-13

[47] Lahaye R, Savolainen V, Duthoit S, et al. A test of psbK-psbI and atpH-atpH as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system(South Africa)[M]. Nature Precedings, 2008; 1-21.

[48] Barcodes P P. Wanted: A barcode for plants[J]. Science, 2007, 318: 190-191.

Research Progress of DNA Barcode in Rare and Endangered Plants

XIE Wei-ling^{1,2}, ZOU Rong², YANG Xue³, TANG Jian-min², CHAI Sheng-feng²

(1. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi 541006; 3. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract: DNA barcode is a hot spot of molecular biology and taxonomic research in the last ten years. It is a method of rapid and accurate species identification with using a shorter standardized DNA fragment, the DNA fragment is easy amplification and has enough variation. In this paper, the standards, advantages of DNA barcode and its analysis methods were briefly described. The research situation of different single barcode fragment and their combinations in rare and endangered plants was mainly summarized. Finally, the prospect of application of DNA barcode in rare and endangered plants were discussed.

Keywords: DNA barcode; species identification; rare and endangered plants; research situation