

猕猴桃 DNA 条形码标记的筛选

叶婵娟¹, 杨妙贤¹, 刘文^{1,2}, 梁红¹

(1. 仲恺农业工程学院 生命科学院, 广东 广州 510225; 2. 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要:以 5 种野生猕猴桃为试验材料, 采用 DNA 条形码技术, 对 6 个 DNA 条形码标记 *rbcL*、*matK*、*psbA*、*trnL-F*、*ITS*、*trnH-psbA* 进行序列分析, 筛选出能鉴别猕猴桃种间分子差异的 DNA 条形码, 以期利用 DNA 条形码技术用于猕猴桃育种。结果表明: 通过序列碱基含量分析, *trnL-F* 和 *ITS* 条形码序列的 GC 含量最高, 为 51.1%~55.2%, *trnH-psbA* 的 GC 含量最小, 约为 32.0%; 通过 Blast 比对, 结果显示 5 个猕猴桃野生种与基因库中已登录种类的 6 个 DNA 条形码相似度在 99% 以上, 而有些与基因库中已登录种类有所差异, 体现出猕猴桃种内的遗传多样性或种间存在基因渗透; 从系统进化树结果分析显示, *ITS* 标记能将上述 5 个野生种明显区分, 基因进化多样性两两比对分析显示, 5 个猕猴桃野生种之间差异明显; Tajima's 中性检验中, *trnL-F*、*ITS* 和 *matK* 具有较高的核苷酸多样性和中性检验值。研究比较了 6 种 DNA 条形码标记, 认为 *ITS* 种间多样性较高, 差异明显, 较适宜作为猕猴桃 DNA 条形码。

关键词:猕猴桃; 野生种; DNA 条形码; 筛选

中图分类号:S 663.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0079-05

猕猴桃属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia* Lindl.) 多年生雌雄异株藤本植物。因为猕猴桃属的种类较多, 有些种和变种的形态非常的接近, 仅仅依靠植物的形态特征进行分类较为困难, 因此, 猕猴桃属植物的系统分类曾先后进行过 4 次修订^[1]。

近年来, 叶绿体 DNA 分析、DNA 保守序列分析、同源基因分析、蛋白质标记、分子生物学标记和 DNA 条形码标记等已越来越多地被应用于植物亲缘关系和进化规律的研究^[2]。DNA 条形码技术是最近十几年发展起来的, 利用标准的、具有足够变异的、易扩增且相对较短

的 DNA 序列来进行分类鉴别的分子生物学手段^[3], 在近缘类群中有很高的准确性^[4]。植物中较常用的 DNA 条形码标记主要有 *rbcL*、*matK*、*psbA*、*trnL-F*、*ITS*、*trnH-psbA*、*UPA*、*rpoB*、*rpoC1*、*atpF-atpH*、*trnS-trnG* 和 *psbK-psbI* 等^[3-5], 其中, *matK+rbcL* 是生命条形码联盟 (consortium for the barcode of life, CBOL) 提出的核心 DNA 条形码组合之一^[5]。*matK* 来源于叶绿体基因编码区, 有较高的变异性, 片段大小也适宜, 但是较难扩增, 而且在不同的植物类群里的引物有差异, 在不同的植物类群中的鉴别率也有很大的差异^[5]。*rbcL* 来源于叶绿体基因编码区, 较容易扩增, 且 *rbcL* 能够鉴别种以上的分类范畴, 但是其进化速率较小, 无法对种内不同分类群进行鉴别^[5]。*trnH-psbA* 来源于核基因非编码区, 在很多植物中都有较高的扩增成功率和物种识别率^[6], 其具有较高的进化速率, 是目前较为理想的条形码, 但 *trnH-psbA* 在不同的植物中扩增出来的 DNA 片段长度差异很大^[5]。*ITS* 来源于叶绿体非编码基因间隔区, 进化速率

第一作者简介:叶婵娟(1990-), 女, 广东茂名市人, 硕士研究生, 研究方向为资源植物学。Email:chanjuanyue@163.com.

责任作者:梁红(1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向为果树遗传育种。E-mail:lhofice@163.com.

基金项目:广东省教育厅科技攻关重点资助项目(粤财教[2011]473号); 广东省科技计划资助项目(2013B090900012)。

收稿日期:2015-07-27

culture were explored. The results showed that the best disinfection time of seeds was 3 minutes or longer. Propagation coefficient of adventitious bud reached 4.0 in the WPS medium with 1.5 mg/L ZT and 0.5 mg/L NAA, and cluster buds grew well. Rooting culture in 1/2 WPM, after 30 days, the rooting rate reached 100%. And plantlets grew strong, roots developed well.

Keywords: *Rhododendron calophytum* Franch; seeds; tissue culture

相对较高,程芳婷等^[7]认为 *trnS-trnG*+*ITS* 的 DNA 片段组合能够很好地对地黄属植物进行鉴定。虽然各种 DNA 条形码在不同植物中都有研究,但并没有哪一种条形码能够区别所有的物种。同一个条形码在不同的物种中表现不同的识别能力。因此,要确定一种或一类植物合适的 DNA 条形码必须经过比较和筛选。

对猕猴桃属进行准确分类是目前猕猴桃植物研究和资源利用的难题之一。该研究尝试通过利用 DNA 条形码来解决这一难题。若能够筛选出能够有效鉴别猕猴桃的 DNA 条形码,并与传统的分类学相结合,将大大地提高了猕猴桃植物分类的准确度,不但能够进一步地完善猕猴桃分类系统,同是也大大地减少了人力物力的支出,可为猕猴桃种质资源保育和猕猴桃新品种选育等工作提供科学依据与参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料均采自广东南岭国家级自然保护区,采集后冷藏运回广州,在实验室进行形态学鉴定,并用

表 2 猕猴桃 DNA 条形码标记引物序列及 PCR 退火温度

Table 2 The primer sequences and PCR anneal temperature of the DNA barcode markers from *Actinidia*

分子标记 Markers	长度 Length of sequence/bp	来源 Gene type	引物序列 Primers	退火温度 Annealing temperature/℃
<i>rbcL</i>	1 118	叶绿体基因编码区	正向:TTGGCAGCATTCCGAGTAA 反向:TGTCTAAAGTTCTCTCCAC	53
<i>matK</i>	889	叶绿体基因编码区	正向:CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG 反向:ACCCAGTCCATCTGGAATCTTGGTTC	58
<i>ITS</i>	738	叶绿体非编码基因间隔区	正向:AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG 反向:TCCTCGCTTATGTATATGC	51
<i>trnL-F</i>	738	叶绿体基因编码区	正向:AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG 反向:TCCTCGCTTATGTATATGC	51
<i>psbA</i>	991	叶绿体基因编码区	正向:CCATGACTGCAATTTTAGAG 反向:ACTTCCATACCAAGGTTAGC	50
<i>trnH-psbA</i>	502	核基因非编码基因间隔区	trnH 端:CGCGCATGGTGGATTACACAATCC psbA 端:GTTATGCATGAACGTAATGCTC	58

1.2.3 PCR 产物回收 扩增产物的回收采用通用型 DNA 纯化回收试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司),并按其说明书介绍的方法操作:将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下,放入干净的离心管中,称取重量。向胶块中加入等倍体积溶液,50℃水浴放置 10 min 左右,其间不断温和地上下翻转离心管,以确保胶块充分溶解。将上一步所得溶液加入一个吸附柱,12 000 r/min 离心 1 min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。向吸附柱中加入 600 μL 漂洗液,12 000 r/min 离心 1 min。倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。将吸附柱置于室温放置数分钟,彻底晾干。将吸附柱放入一个干净离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加适量的洗脱缓冲液,室温放置 2 min。12 000 r/min

于提取 DNA 取材。

1.2 试验方法

1.2.1 猕猴桃总 DNA 提取 总 DNA 提取参照叶婵娟等^[8]的方法进行。

1.2.2 DNA 扩增(PCR) PCR 反应体系总体积为 25 μL,其中包含:10×*Taq* PCR Mix 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,10 mmol/L dNTPs 1.0 μL,DNA 模板 0.5 μL,ddH₂O 8.5 μL,引物 F/R 各 0.5 μL^[9]。扩增程序:94℃ 4 min;94℃ 30 s,退火 30 s,72℃ 45 s,35 循环;72℃ 5 min,4℃ 终止。具体的引物序列和退火温度见表 2。

表 1 试验材料名称及编号

Table 1 Origin and serial number of plant materials

编号 No.	名称 Scientific name	材料来源地点 Source
1	金花猕猴桃 <i>A. chrysantha</i> C. F. Liang	阳山 朴杓水
2	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i> C. F. Liang	阳山 323 国道
3	阔叶猕猴桃 <i>A. latifolia</i>	阳山 龙潭角
4	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	阳山 323 国道
5	毛花猕猴桃 <i>A. eriantha</i>	阳山 秤架

离心 2 min,收集 DNA 溶液。

1.2.4 回收 DNA 的连接转化 按表 3 依次将试剂添加到 200 μL PCR 管中,16℃反应 30 min 后全量加入至 100 μL DH5α 感受态细胞(TaKaRa)中,冰中放置 30 min,42℃加热 45 s 后,再在冰中放置 1 min。然后加入 890 μL LB 培养基,37℃振荡培养 60 min,在含有 Amp 的 LB-琼脂

表 3 PCR 产物连接转化的体系

Table 3 The reactions of ligation and transformation

试剂 Reagent	用量 Utilization/μL
pMD19-TV Vector	1
Solution I	5
Insert DNA	3
ddH ₂ O	1

注:pMD19-T Vector Cloning Kit 试剂盒购于 TaKaRa。

平板培养基上涂布培养,形成单菌落。挑取单菌落置于含 Amp 的 LB 液体培养基中,180 r/min 振荡培养 12 h,菌液 PCR 检测后送上海英骏生物技术有限公司测序。

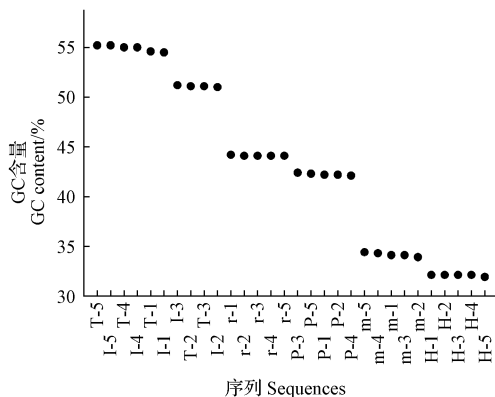
1.3 数据分析

测序获得的序列信息通过 DNAMAN 结合 chromas 软件辅以手工校正,所有序列均在 NCBI 中进行 Blast 比对,筛选出最接近的序列,筛选原则为选 Ident 值最大的,若 Ident 值同样大,则选择最上方的比对结果。利用 MEGA 6.0 对序列进行序列间基因进化多样性分析、核苷酸含量比例分析和基因 Tajima's 中性检验,并用邻接算法(Neighbor-Joining) 构建了系统进化树。

2 结果与分析

2.1 扩增序列 GC 含量分析

从图 1 可以看出,*trnL-F* 和 *ITS* 的序列中 GC 含量最大,为 51.1%~55.2%,而 *trnH-psbA* 的 GC 含量最小,约为 32.0%。猕猴桃的 *trnL-F* 和 *ITS* 在不同种间的 GC 含量差异较大,而其它 4 个条形码标记的种间 GC 含量差异都非常小。



注: T 为 *trnL-F*; I 为 *ITS*; r 为 *rbcL*; P 为 *psbA*; m 为 *matK*; H 为 *trnH-psbA*; 1~5 分别为: 金花猕猴桃 *A. chrysantha* C. F. Liang, 美味猕猴桃 *A. deliciosa* C. F. Liang, 阔叶猕猴桃 *A. latifolia*, 中华猕猴桃 *A. chinensis*, 毛花猕猴桃 *A. eriantha*, 下同。

图 1 猕猴桃 DNA 扩增序列 GC 含量

Fig. 1 GC content of the amplified DNA sequence of *Actinidia*

2.2 序列比对

经过测序的 DNA 扩增序列在 NCBI 中进行 Blast 比对,从表 4 可以看出,*trnH-psbA* 和 *ITS* 的比对发现,有 3 个野生种是与 NCBI 登录种一致;*matK*,*rbcL* 和 *psbA* 的比对结果中,野生种鉴定序列与 NCBI 登录种不一致现象明显;而 *trnL-F* 比对结果中,有 2 个野生种与 NCBI 登录种一致。部分研究材料与基因库中的种类不完全一致的现象,体现出猕猴桃种内存在较高的 DNA 扩增序列多态性,或可能存在种间基因渗透。

表 4 猕猴桃 DNA 扩增序列在 GeneBank 上的 Blast 鉴定

Table 4 The GeneBank Blast identity based on amplified DNA sequences of *Actinidia*

序列编号 Sequences	鉴定种 Species identify	NCBI 登录种 Species login on NCBI	最接近的登录号 Accessions	相似度 Similarity/ %
H-1	<i>A. chrysantha</i>	<i>A. chrysantha</i>	KC519940.1	100
H-2	<i>A. deliciosa</i>	<i>A. deliciosa</i>	JQ218228.1	100
H-3	<i>A. latifolia</i>	<i>A. latifolia</i>	KC519937.1	100
H-4	<i>A. chinensis</i>	<i>A. deliciosa</i>	JQ218228.1	100
H-5	<i>A. eriantha</i>	<i>A. deliciosa</i>	JQ218228.1	99
I-1	<i>A. chrysantha</i>	<i>A. chrysantha</i>	KC519755.1	100
I-2	<i>A. deliciosa</i>	<i>A. callosa</i>	AF323829.1	99
I-3	<i>A. latifolia</i>	<i>A. latifolia</i>	AF323825.1	100
I-4	<i>A. chinensis</i>	<i>A. callosa</i>	AF323829.1	99
I-5	<i>A. eriantha</i>	<i>A. eriantha</i>	AF323800.1	99
m-1	<i>A. chrysantha</i>	<i>A. chrysantha</i>	AF322603.1	99
m-2	<i>A. deliciosa</i>	<i>A. callosa</i> var. <i>strigillosa</i>	AF322620.1	99
m-3	<i>A. latifolia</i>	<i>A. eriantha</i> f.	AF322617.1	99
m-4	<i>A. chinensis</i>	<i>A. sabiiifolia</i>	AF322617.1	99
m-5	<i>A. eriantha</i>	<i>A. eriantha</i>	AF322617.1	99
P-1	<i>A. chrysantha</i>	<i>A. kolomikta</i>	AY323410.1	99
P-2	<i>A. deliciosa</i>	<i>A. kolomikta</i>	AY323410.1	99
P-3	<i>A. latifolia</i>	<i>A. kolomikta</i>	AY323410.1	99
P-4	<i>A. chinensis</i>	<i>A. kolomikta</i>	AY323410.1	99
P-5	<i>A. eriantha</i>	<i>A. kolomikta</i>	AY323410.1	99
r-1	<i>A. chrysantha</i>	<i>A. chinensis</i>	L01882.2	99
r-2	<i>A. deliciosa</i>	<i>A. chinensis</i>	L01882.2	99
r-3	<i>A. latifolia</i>	<i>A. chinensis</i>	L01882.2	99
r-4	<i>A. chinensis</i>	<i>A. chinensis</i>	L01882.2	99
r-5	<i>A. eriantha</i>	<i>A. chinensis</i>	L01882.2	99
T-1	<i>A. chrysantha</i>	<i>A. chrysantha</i>	KC519755.1	99
T-2	<i>A. deliciosa</i>	<i>A. callosa</i> var. <i>strigillosa</i>	AF323829.1	100
T-3	<i>A. latifolia</i>	<i>A. latifolia</i>	AF323825.1	100
T-4	<i>A. chinensis</i>	<i>A. latifolia</i>	AF323825.1	100
T-5	<i>A. eriantha</i>	<i>A. styracifolia</i>	AF323822.1	99

2.3 进化关系分析及条形码筛选

对 5 个野生种同一扩增序列之间遗传距离进行计算,由表 5 可知,*rbcL* 的遗传距离最小,绝大多数在 0.002 以下;*matK* 和 *psbA* 的平均遗传距离较大,*ITS* 次之。NJ 聚类方法分析结果表明,*ITS* 序列构建的系统发育树,能够将 5 个猕猴桃野生种有效区分,不同物种形成单系分支的比例最高;*matK* 和 *trnL-F* 次之,*trnH-psbA* 序列构建的系统发育树中不同物种形成单系分支的百分比最低(图 2)。综合以上 2 个结果分析,只有 *ITS* 能将 5 个野生种区分开来,因而更适合作为猕猴桃种间鉴别的 DNA 条形码。

从表 6 可以看出,分离位点数最多的是 *matK*,差异碱基达到 804 个,其次是 *ITS*,最少的是 *trnH-psbA* 和 *rbcL*,仅有 2 个差异碱基;核苷酸多态性的结果中,除了

表 5
Table 5
Estimates of evolutionary divergence between sequences

<i>trnH-psbA</i>					<i>ITS</i>					<i>rbcL</i>					<i>trnL-F</i>					<i>matK</i>					<i>psbA</i>					
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
1	0					0					0					0					0					0				
2	0.002	0				1.257	0				0.002	0				1.150	0				0.005	0				0	0			
3	0.002	0	0			1.292	1.436	0			0.001	0.001	0			1.174	1.249	0			7.116	7.085	0			0	0	0		
4	0.002	0	0	0		1.246	0.003	1.431	0		0.002	0	0.001	0		1.150	0	1.249	0		10.560	10.440	11.140	0		24.370	24.370	24.370	0	
5	0.004	0.002	0.002	0.002	0	1.317	1.405	0.087	1.400	0	0.002	0	0.001	0	0	1.183	1.236	0.085	1.236	0	7.116	7.085	0.001	11.140	0	0.001	0.001	0.001	24.370	0

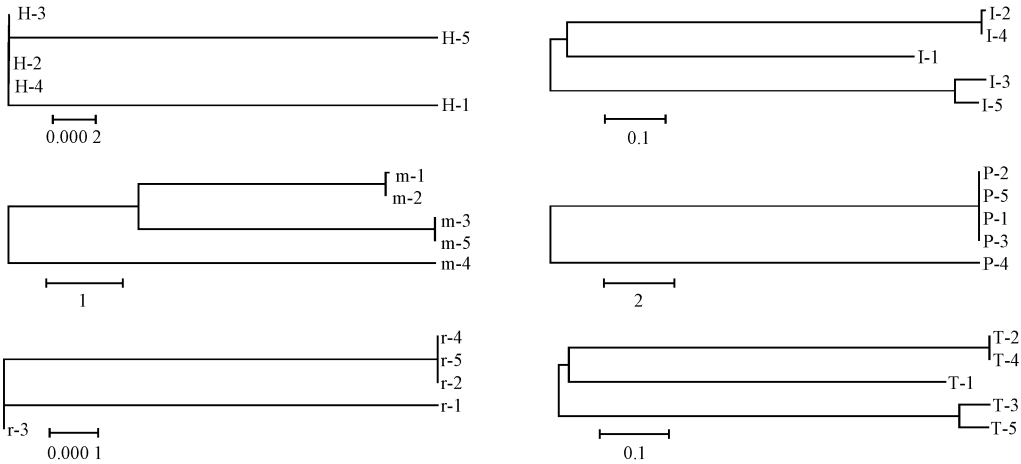


图 2 基于 DNA 扩增序列构建的系统进化树

Fig. 2 The NJ tree be built by the amplified DNA sequences

trnH-psbA 和 *rbcL* 外,其余 4 个 DNA 条形码均较高; Tajima's 中性检验中,*trnL-F* 和 *ITS* 值较高,最小的是 *trnH-psbA*。因此,*trnL-F*、*ITS* 和 *matK* 这 3 个 DNA 条形码具有较高的核苷酸多样性和中性检验值。

表 6 DNA 条形码标记 Tajima's 中性检验

Table 6 Tajima's test of the 6 DNA barcode markers				
DNA 条形码	分离位	分离位点数	变异核苷酸	Tajima's
DNA barcode	点数 S	百分比 ps	多态性 π	中性检验 D
<i>trnH-psbA</i>	2	0.004 0	0.001 6	-0.973 0
<i>ITS</i>	604	0.825 1	0.530 5	2.594 3
<i>rbcL</i>	2	0.001 8	0.000 9	0.243 1
<i>trnL-F</i>	603	0.823 8	0.529 6	2.595 4
<i>matK</i>	804	0.905 4	0.563 4	2.266 6
<i>psbA</i>	147	0.148 3	0.059 3	-1.270 0
合计 Total	4 281	0.862 8	0.605 0	3.526 6

3 讨论

DNA 条形码在植物学研究中的应用具有非常重要的现实指导意义。例如,利用 DNA 条形码鉴别药材的真伪^[10-11],一定程度上消除了用药的安全隐患;除此以外,DNA 条形码还被广泛地应用于鉴别物种间的亲缘关系^[12-14],但在猕猴桃中的应用研究相对较少。猕猴桃仅通过形态进行分类存在非常大的困难,因为猕猴桃很多种的形态都非常接近,存在许多主观的判断因素,且形态分类方法受到了时间和空间的限制,若能筛选出适

合猕猴桃的条形码,对猕猴桃的分类鉴别、种质资源保护和品种选育等都具有非常重要的意义。

有研究表明,当 2 个分类单元的 DNA 之间 GC 含量相差 10%~12%时应考虑划分为不同属;在分析细菌的系统发育关系时,GC 含量也是一个非常关键的指标,GC 含量越接近,亲缘关系越近^[15]。该研究通过比较各个扩增序列的 GC 含量,粗略地分析了不同猕猴桃 DNA 条形码序列差异,结合形态学分类的结果,可以在一定程度上分析出哪一个 DNA 条形码更适合猕猴桃。

DNA 条形码作为一种鉴别物种属间和种间差异的有效技术,在兰科、枇杷属和猕猴桃属等物种中均有利用。现有研究表明,*trnH-psbA* 对兰科植物有高达 90% 的识别率^[16],并有效地进行枇杷属内物种鉴别及属间分类^[17];另外,*rbcL* 和 *trnH-psbA* 组合可作为整个陆地植物的条形码^[16],但是 *rbcL* 和 *trnH-psbA* 在猕猴桃种的识别率却非常低,这是由于同一片段在不同物种中的进化速率存在较大的差异。*rbcL* 和 *matK* 曾被 CBOL 推选为陆地植物通用的条形码,在高等植物研究中有非常重要的意义^[18];*matK* 在许多植物中都有非常高的识别率,例如,*matK* 序列在半夏属中的识别率就为 88.00%^[11]。在猕猴桃中,*matK* 虽然不能将所有的种都区分开来,但也有非常高的识别率。*trnL-F* 常被用于亲缘关系的研究,其中 *trnL-F* 在 5 种苍术属药用植物中也

呈现了较高的识别率^[19], *trnL-F* 在猕猴桃的研究中与 *matK* 一样呈现了较高的差异性,也可作为候选条形码之一。*ITS* 全序列在有些植物难以获取^[7],但在猕猴桃中却较容易扩增,且其在种间基因进化多样性分析和 Tajima's 中性检验中都有较大的差异,具备了作为条形码的几个特征,可初步筛选出来作为猕猴桃的 DNA 条形码应用于种及变种的鉴别。

刘宇婧等^[6]认为用一个条形码区别所有的物种是不可能的,闫化学等^[16]认为变异较大的 DNA 条形码适合于鉴别属和种以下的分类阶元,进化速率较快的基因才能将亲缘关系较近的种区别开来,即不同的分类阶元对 DNA 条形码的要求会有一定的差异,任保青等^[18]提出了 *rbcL*(科)+*matK*(属)+*ITS* 和 *trnH-psbA*(种)这一组合作为陆地植物 DNA 条形码组合。该试验结果表明,该 DNA 条形码组合与猕猴桃的 DNA 条形码情况较吻合,可将这一组合作为猕猴桃 DNA 条形码研究的候选组合,以期能够大大地提高鉴别的准确性。在接下来的研究中拟采用更多的猕猴桃种、变种和品种进一步检验该 DNA 条形码组合在猕猴桃中的适用范围。

参考文献

- [1] 黄宏文. 猕猴桃属·分类·资源·驯化·栽培[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 1.
- [2] 刘文, 梁红, 杨碧忍, 等. 一种高等植物小片段 RNA 分子标记方法[J]. 生物多样性, 2012, 20(1): 86-93.
- [3] FIŠER PEČNIKAR Ž, BUZAN E V. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application[J]. Journal of Applied Genetics, 2014, 55(1): 43-52.
- [4] 裴男才, 陈步峰. 生物 DNA 条形码: 十年发展历程、研究尺度和功能[J]. 生物多样性, 2013, 21(5): 616-627.
- [5] LI X W, YANG F, HENRY R J, et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome[J]. Biological Reviews, 2014, 90(1): 1-10.
- [6] 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.
- [7] 程芳婷, 李忠虎, 刘春艳, 等. 地黄属植物的 DNA 条形码研究[J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 25-32.
- [8] 叶婵娟, 刘明锋, 刘文, 等. 广东省猕猴桃种质资源 *rbcL* 基因的多样性分析[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2013, 26(4): 1-6.
- [9] 高连明, 刘杰, 蔡杰, 等. 关于植物 DNA 条形码研究技术规范[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(6): 592-606.
- [10] 孙涛, 滕少娜, 孔德英, 等. DNA 条形码技术应用于人参鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(4): 143-148.
- [11] 郑司浩, 魏文龙, 任伟光, 等. 基于 DNA 条形码的半夏属及其伪品分子鉴别[J]. 植物学报, 2014, 49(6): 710-719.
- [12] 罗焜, 陈士林, 陈科力, 等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究[J]. 中国科学(生命科学), 2010, 40(4): 342-358.
- [13] 李妮, 陈士林, 刘义梅. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1396-1400.
- [14] 王柯, 陈科力, 刘震, 等. 锦葵科植物 DNA 条形码通用序列的筛选[J]. 植物学报, 2011, 46(3): 276-284.
- [15] 东秀珠, 沈德龙, 玉华. 16S rDNA 同源性所揭示的双歧杆菌与有关细菌的亲缘关系[J]. 生物多样性, 2000, 8(2): 146-152.
- [16] 闫化学, 于杰. DNA 条形码技术在植物中的研究现状[J]. 植物学报, 2010, 45(1): 102-108.
- [17] 胡文舜, 蒋际谋, 黄爱萍, 等. 2 种枇杷属植物的 *trnH-psbA* 条形码序列变异及其近缘属系统发育初步研究[J]. 热带作物学报, 2014, 35(1): 12-16.
- [18] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术[J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1-12.
- [19] 葛燕芬, 杭悦宇, 夏冰, 等. 5 种苍术属药用植物的 *trnL-F* 序列测定及种间遗传关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(2): 12-16.

Screening of DNA Barcode for *Actinidia*

YE Chanjuan¹, YANG MiaoXian¹, LIU Wen^{1,2}, LIANG Hong¹

(1. College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225; 2. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: DNA barcode technology could used for the kiwifruit breeding usually. In this study, six DNA barcode, *rbcL*, *matK*, *psbA*, *trnL-F*, *ITS* and *trnH-psbA* were used to identify five wild species of *Actinidia*. The results showed that, GC contents of *trnL-F* and *ITS* were higher, with the range from 51.1% to 55.2%, while *trnH-psbA* had the lowest GC content (32.0%). Above all six DNA barcode markers were blasted in NCBI (National Center for Biotechnology Information), the results showed that the sequences similarity was more than 99% between the wild species of *Actinidia* and the species of *Actinidia* logged on NCBI, and there were different similarity levels among the different DNA barcode. Thus, these results revealed the intraspecific diversity of *Actinidia* or penetration among different species of *Actinidia*. Then, the *ITS* marker could be used to identify all the above 5 species of *Actinidia* according to the NJ (Neighbor-Joining) tree. And the evolutionary divergence among 5 species was obvious in *ITS* sequences. The *trnL-F*, *ITS* and *matK* barcode had higher diversity of nucleotide and Tajima's test value. By the means of sequence analysis with the six DNA markers, *ITS* presented excellently in variation of *Actinidia*, because of its higher nucleotide diversity and obvious difference among different taxa.

Keywords: *Actinidia*; wild species; DNA barcoding; screening