

特色桑品种资源 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列与亲缘关系分析

刘玲¹, 张佳钰¹, 范小敏², 陈祥平², 柯皓天², 黄昊翔¹, 贾庭豪¹, 李天星¹, 付乐章¹, 陈仁芳¹

(¹西南大学生物技术学院, 重庆 400716; ²四川省丝绸工程技术研究中心, 成都 610031)

摘要:为了更好地开发利用特色桑树品种, 分析了龙桑、龙须桑等 12 个特色桑资源 ITS、TrnL-F、rps16 碱基序列的长度、G + C 含量、亲缘关系、遗传距离及信息变异位点。结果表明, ITS 间隔区 (包括 5.8S) 全长为 576 ~ 590 bp, G + C 含量 59.38% ~ 60.17%; TrnL-F 间隔区 (包括 TrnL 内含子) 全长为 920 ~ 923 bp, G + C 含量为 34.02% ~ 34.24%; rps16 内含子全长为 929 ~ 947 bp, G + C 含量为 32.51% ~ 33.26%。亲缘关系分析显示, 分支图首先将外类群—构树分出, 紧接着分出的是新疆黑桑。再依次为咸丰长穗桑、钦州长果桑、神农华桑、广东大 10、雅安白桑、斯里兰卡 1 号、湖北蒙桑 4 号、龙桑、和田白桑, 龙须桑、剑持、小冠桑在分支树的最顶层。根据外类群确定法, 新疆黑桑为原始类型, 龙须桑、剑持、小冠桑为最进化类型。遗传距离分析显示, 新疆黑桑、剑持、咸丰长穗桑、钦州长果桑、小冠桑与其他桑属材料的遗传距离分别为 1.0 ~ 1.3、0.2 ~ 0.3、0.1 ~ 0.4、0.1 ~ 0.2、0 ~ 0.3, 龙桑、斯里兰卡 1 号、雅安白桑、和田白桑、广东大 10、龙须桑、湖北蒙桑 4 号与其他桑属材料间遗传距离差异不大。信息变异位点分析显示共有 14 个信息位点, 占总位点数的 0.5564%。变异主要发生在外类群—构树和新疆黑桑, 且变异大多集中在 ITS 区域。ITS、TrnL-F 和 rps16 三片段分析桑属的亲缘关系, 信息位点不足, 有待深入研究。

关键词:特色桑资源; ITS、TrnL-F、rps16 序列; 遗传距离; 亲缘关系

Analysis of ITS, TrnL-F, rps16 Sequence and Genetic Relationship of Characteristic Mulberry Resources

LIU Ling¹, ZHANG Jia-yu¹, FAN Xiao-min², CHEN Xiang-ping², KE Hao-tian², HUANG Hao-xiang¹, JIA Ting-hao¹, LI Tian-xing¹, FU Le-zhang¹, CHEN Ren-fang¹

(¹College of Biotechnology, Southwestern University, Chongqing 400716;

²The Sichuan Silk Engineering Research Center, Chengdu 610031)

Abstract: In order to understand the characteristics of mulberry resources, we analyzed the sequences of ITS, TrnL-F, and rps16 including the length, G + C content, genetic distance, and parsimony informative sites using 12 characteristic mulberry resources. The results indicated that the length of mulberry ITS sequence (including 5.8S) was 576 – 590 bp with G + C content of 59.38% – 60.17%. The length of TrnL-F sequence (including TrnL intron) was 920 – 923 bp with G + C content of 34.02% – 34.24%. And the length of rps16 intron was 929 – 947 bp with the G + C content of 32.51% – 33.26%. In the Cladogram built by mrbayes software, *Broussonetia papyrifera* was separated first, the remainders were arranged in the following order: Xinjiang *M. nigra*, Xianfeng *M. mizuho*, Qinzhou *M. macroura*, Shennong *M. cathayana*, Guangdong da shi, Ya'an *M. alba*, Sri Lanka No. 1, Hubei *M. mongolica* No. 4, *M. alba* var. *Tortuosa*, Hetian *M. alba*, *M. alba* var. *pendula* Jianchi, Xiao guan sang, located in the top-most of the cladogram. Based on the outgroup, Xinjiang *M. nigra* was a primitive type, while *M. alba* var. *pendula*, Jianchi and Xiao guan sang were the most evolutionary type. The genetic distances between Xinjiang *M. nigra*, Jianchi, Xianfeng *M. wittiorum*, Qinzhou *M. macroura*, Xiao guan sang and others was 1.0 – 1.3, 0.2 – 0.3, 0.1 – 0.4,

收稿日期: 2013-08-26 修回日期: 2014-04-01 网络出版日期: 2014-08-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140814.0927.003.html>

基金项目: 四川省科技计划项目 (2013NZ0048)

第一作者研究方向为桑资源及分类。E-mail: liuling1022@yeah.net

通信作者: 陈仁芳, 研究方向为桑资源及分类。E-mail: crf55@163.com

0.1–0.2, 0.0–0.3, respectively. And the genetic distances of *M. alba* var. *Tortuosa*, Sri Lanka No. 1, Ya'an *M. alba*, Hetian *M. alba*, Guangdong da shi, *M. alba* var. *pendula* and Hubei *M. Mongolica* No. 4 to others was almost the same. There were 14 parsimony information sites, which accounted for 0.5564% of all sites. Variations occurred in *Broussonetia papyrifera* and Xinjiang *M. nigra*, and they were mostly concentrated in ITS regions. However, the parsimony information sites were insufficient to analyse the genetic relationship among *Morus* with three segments (ITS, TrnL–F, rps16), suggesting more work should be done to resolve the problem.

Key words: characteristic mulberry resources; ITS, TrnL-F, rps16 sequence; genetic distance; genetic relationship

随着蚕桑产业的发展,在桑资源的研究基础上发掘一些特色桑树种质就显得格外重要。本课题组在进行桑资源分子系统学研究过程中,收集到龙桑(*Morus alba* var. *Tortuosa*)、龙须桑(*M. alba* var. *pendula*)等 12 个特色桑树品种资源,且这些桑树品种资源均具有一定的开发应用价值。龙桑又名弯条桑、九曲、九纹龙,生长后期由于枝条弯曲盘旋似飞龙行走而得名,可用作各种园林造型^[1-2];龙须桑又名垂枝桑,枝条柔软下垂,具有园林价值^[3-4];雅安白桑、广东大 10、钦州长果桑、咸丰长穗桑均是较独特的果用桑类型。雅安白桑果多、味甜。咸丰长穗桑、广西钦州长果桑果形特长、风味独特,又有特殊的观赏价值^[5-6]。广东大 10 还是三倍体无子果桑,更具开发价值。和田白桑抗旱、耐寒性强。斯里兰卡 1 号与雅周桑明显不同,具有扦插易生根、木质硬的特点,用于扦插繁殖,一步成园,是很好的资源^[7]。剑持、小冠桑叶质优,发芽早,为稚蚕用桑品种。湖北蒙桑 4 号则可生长在非常干旱的环境中,根系发达,能保持水土流失,为独特生态桑资源。神农华桑为优质木材桑,生长直立、乔木、速生、成林早,可作优质木材桑在林业上推广应用。

ITS、TrnL-F、rps16 序列均为基因间区(IGS, intergenic spacer)或内含子(intron)非编码区,受选择的压力较小,进化速率较快,多用于被子植物属、种、种系的系统进化、亲缘关系分析^[8-19]。从分子水平探讨农作物遗传资源的亲缘关系有许多研究^[20-25]。在桑树上已有利用 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列探讨亲缘关系的相关研究^[26-32],但未见龙桑、龙须桑等特色桑资源的研究报道。因此,本研究测定了 12 个特色桑资源的 ITS、TrnL-F 和 rps16 碱基序列,分析了片段长度、G+C 含量、亲缘关系、遗传距离、信息位点、栽培大致范围,为特色桑资源开发、利用积累了一定的分子生物学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料取自西南大学、湖北蚕业研究所、广东蚕业研究所、四川三台桑资源圃、广西钦州百果园,为了评鉴特色桑资源的亲缘关系,参考陈仁芳等^[32]增加我国桑属植物 13 个种、变种(桑属 *Koidzumi* 分类系统)及外类群—构树 *Broussonetia papyrifera*(表 1)。

1.2 DNA 提取及其质量检测

采用 CTAB 法^[33]稍加改进,从 0.15 g 左右硅胶干燥的桑叶中提取总 DNA。质量和浓度分别用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光核酸测定仪(GENEQUANT, Eppendorf, Gemany)检测确认。

1.3 PCR 扩增与测序

PCR 扩增反应总体积 20 μ L,其中含 10 ng DNA 模板,50 ng 正反向引物,2.5 mmol/L 的 dNTPs,10 \times PCR Buffer 和 5 U *Taq* DNA 聚合酶。ITS、TrnL-F 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 33 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,反应结束控制在 12 $^{\circ}$ C。rps16 扩增程序为 80 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后每个循环 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,50 $^{\circ}$ C 退火 1 min,65 $^{\circ}$ C 延伸 4 min,共 30 个循环,65 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,反应结束后控制在 12 $^{\circ}$ C。扩增引物 ITS 5': 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'; ITS 4': 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'^[34], TrnL-F cpDNA-c: 5'-CGAAATCGGGTAGACGCTACG-3'; TrnL-F cpDNA-f: 5'-ATTTGA ACTGGTGACACG AG-3'^[35], rps16-F: 5'-GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT-3'; rps16 - R2: 5'-TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC-3'^[36],引物由上海生工合成。

1.4 数据分析

测序结果采用 Sequencher 4.1.4 软件拼接,对少数误判碱基,根据碱基峰形进行更正。采用 Clustalx 1.83c 软件进行序列比对,Bioedit 软件除

去两端非序列碱基。采用 DNASTAR 软件分析各序列长度、G + C 含量、遗传距离。采用 PAUP Version 4.0b10 和 Modeltest V3.06^[25] 软件测定可能的分支概率 (hLRTs, hierarchical likelihood ratio tests) 混合卡方概率值 (mixed chi-square distribu-

tion), 以决定三片段是否能合并。采用 DnaSP v. 5.10.00 软件^[38] 分析 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列信息变异位点。测定最佳模型 AIC 值 (akaike information criterion), 并运用 mrbayes 软件^[39] 进行亲缘关系分析。

表 1 特色桑树品种资源信息

Table 1 Information of characteristic mulberry varieties resources

编号 Code	材料名称 Material name	利用价值 Utilization value	采集地/来源 Locus/Source	拉丁名 Latin name	登录号 GenBank accession ITS/TrnL-F/rps16
1	龙桑	园林	中国罗田	<i>M. alba</i> var. <i>Tortuosa</i>	AB604281/JN006353/JN006313
2	斯里兰卡 1 号	扦插易生根	斯里兰卡	<i>M. alba</i>	AB604288/JN006346/JN006339
3	钦州长果桑	果用	中国广西	<i>M. macroua</i>	AB604290/JN006381/JN006289
4	剑持	稚蚕用	日本	<i>M. bombycis</i>	AB604246/JN006417/JN006325
5	咸丰长穗桑	果用	中国湖北	<i>M. wittorum</i>	AB604225/JN006370/JN006334
6	雅安白桑	果用	中国雅安	<i>M. alba</i>	AB604269/JN006402/JN006324
7	和田白桑	抗旱耐寒	中国和田	<i>M. alba</i>	AB604247/JN006351/JN006288
8	神农华桑	木材	中国神农架	<i>M. cathayana</i>	AB604280/JN006412/JN006292
9	广东大 10	果用	中国广东	<i>M. atropurpurea</i>	AB604277/JN006379/JN006296
10	龙须桑	园林	日本	<i>M. alba</i> var. <i>pendula</i>	AB604244/JN006349/JN006333
11	小冠桑	稚蚕用	中国重庆	<i>M. alba</i>	AB604242/JN006350/JN006304
12	湖北蒙桑 4 号	固沙防水土流失	中国湖北	<i>M. mongolica</i>	AB604266/JN006405/JN006300
13	昆明白桑	评鉴	中国昆明	<i>M. alba</i>	AB604289/JN006344/JN006340
14	裂叶火桑	评鉴	中国浙江	<i>M. mizuho</i>	AB604249/JN006392/JN006291
15	四川鬼桑	评鉴	中国四川	<i>M. mongolica</i> var. <i>diabolica</i>	AB604275/JN006408/JN006290
16	广东荆桑	评鉴	中国广东	<i>M. atropurpurea</i>	AB604248/JN006391/JN006285
17	荣经川桑	评鉴	中国荣经	<i>M. notabilis</i>	AB604228/JN006372/JN006303
18	神农架山桑	评鉴	中国神农架	<i>M. bombycis</i>	AB604254/JN006354/JN006311
19	神农架鸡桑	评鉴	中国神农架	<i>M. australis</i>	AB604251/JN006393/JN006275
20	新疆黑桑	评鉴	中国和田	<i>M. nigra</i>	AB604291/JN006374/JN006331
21	云南毛叶奶桑	评鉴	中国西双版纳	<i>M. macroua</i> var. <i>mawa</i>	AB604229/JN006414/JN006276
22	四川华桑	评鉴	中国四川	<i>M. cathayana</i>	AB604230/JN006394/JN006306
23	四川长果桑	评鉴	中国四川	<i>M. macroua</i>	AB604232/JN006376/JN006330
24	湖北蒙桑 3 号	评鉴	中国湖北	<i>M. mongolica</i>	AB604264/JN006345/JN006341
25	利川长穗桑	评鉴	中国湖北	<i>M. wittorum</i>	AB604226/JN006404/JN006322
26	重庆构树	外类群	中国重庆	<i>B. papyrifera</i>	AB604292/JN006419/JN006343

2 结果与分析

2.1 特色桑 ITS、TrnL-F、rps16 序列长度以及 G + C 含量分析

根据 GenBank 已发表的鲁桑 (AM042003) 18S rRNA 基因 3' 端、26S rRNA 基因 5' 端、5.8S rDNA 基因碱基, 白桑 (AF501608) tRNA-Leu 基因 3' 端、tRNA-Phe 5' 端碱基, 白桑 (EF687683) rps16 基因内含子的上游 3' 端和下游 5' 端碱基, 分别确定本试验特色桑资源的 ITS、TrnL-F、rps16

序列范围, 用 Bioedit 软件除去两端非序列碱基, DNASTAR 软件分析各序列长度以及 G + C 含量, 分析结果见表 2。ITS 长度 (包括 5.8S) 除咸丰长穗桑为 590 bp, 和田白桑、龙须桑为 577 bp 外, 其他均为 576 bp。TrnL-F 间隔区 (包括 TrnL 内含子) 除剑持为 920 bp 外, 其他均为 923 bp。rps16 内含子除和田白桑为 947 bp 外, 其他均为 929 bp。ITS、TrnL-F 和 rps16 序列 G + C 含量分别为 59.38% ~ 60.17%、34.02% ~ 34.24%、32.51% ~ 33.62%。

表 2 特色桑 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列长度以及 G + C 含量

Table 2 ITS, TrnL-F, and rps16 sequence length and G + C content of characteristic mulberry resources

特色桑树 品种 Characteristic mulberry	长度 (bp) Length			G + C 含量 (%) G + C content		
	ITS	TrnL-F	rps16	ITS	TrnL-F	rps16
龙桑	576	923	929	59.55	34.13	32.62
斯里兰卡 1 号	576	923	929	59.55	34.13	32.62
钦州长果桑	576	923	929	59.72	34.02	32.51
剑持桑	576	920	929	59.38	34.24	32.62
咸丰长穗桑	590	923	929	60.17	34.02	32.62
雅安白桑	576	923	929	59.55	34.02	32.62
和田白桑	577	923	947	59.45	34.13	33.26
神农华桑	576	923	929	59.90	34.02	32.62
广东大 10	576	923	929	59.55	34.02	32.62
龙须桑	577	923	929	59.45	34.13	32.62
小冠桑	576	923	929	59.55	34.13	32.62
湖北蒙桑 4 号	576	923	929	59.55	34.13	32.62

2.2 特色桑树品种亲缘关系 mrbayes 分支图

用 PAUP Version 4.0b10 和 Modeltest V3.06 软件测定 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列可能的分支概率 (hLRTs) 混合卡方概率值 (P-value) 分别为 0.267144、0.658998 和 0.658998; 测定最佳模型分别为 (GTR + G)、(GTR) 和 (GTR + G), 表明可以进行合并计算。将三片段合并计算碱基进化模型为 GTR, 基于该模型, 采用 mrbayes 软件构建进化分支图, 进行亲缘关系分析。

分支图根由外类群方法固定, 树长 191 步, 一致性指数 (CI, consistency index) 0.9895, 保持性指数 (RI, retention index) 0.9429, 调整后的一致性指数 (RC, rescaled consistency) 0.9330。分支图首先将外类群—构树分出, 紧接着分出的是新疆黑桑, 靴带支持率 (bootstrap) 100%。再依次为咸丰长穗桑、钦州长果桑、神农华桑、广东大 10、雅安白桑、斯里兰卡 1 号、湖北蒙桑 4 号、龙桑、和田白桑, 龙须桑、剑持、小冠桑在分支树的最顶层。根据外类群确定法, 新疆黑桑为原始类型, 龙须桑、剑持、小冠桑是进化类型。各特色桑亲缘关系、系统位置 (图 1)。

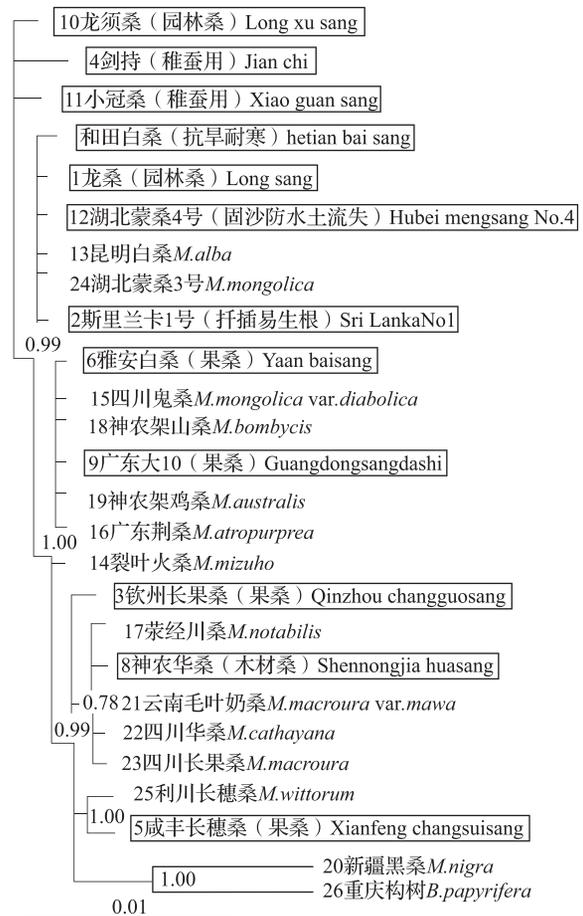


图 1 基于 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列特色桑品种资源亲缘关系 mrbayes 分支图

Fig. 1 The mrbayes cladogram for characteristic mulberry genetic relationship based on ITS, TrnL-F, and rps16 sequence

2.3 基于 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列特色桑树种遗传距离、信息变异位点分析

用 DNASTAR 软件分析合并序列的遗传距离, 最远的是外类群—构树, 与桑属其他材料的遗传距离为 7.1 ~ 7.4。新疆黑桑、剑持、咸丰长穗桑、钦州长果桑、神农华桑与其他桑属材料遗传距离分别为 1.0 ~ 1.3、0.2 ~ 0.3、0.1 ~ 0.4、0.1 ~ 0.2、0.2 ~ 0.3。而龙桑、斯里兰卡 1 号、雅安白桑、和田白桑、广东大 10、龙须桑、湖北蒙桑 4 号与其他桑属材料遗传距离差异不大, 其中与大部分材料遗传距离为 0。

用 DnaSP v. 5.10.00 软件分析信息变异位点共 14 个, 占总位点数的 0.5564%。其中转换 8 个, 颠换 6 个。变异主要发生在外类群—构树和新疆黑桑, 且大多集中在 ITS 序列区域 (表 3)。

表 3 比对序列信息位点

Table 3 Parsimony informative sites

编号 Code	材料名称 Material name	ITS									TrnL-F				Rps16
		9	34	45	154	168	311	347	459	560	672	877	1309	1431	1736
1	荣经川桑	C	T	G	A	T	A	A	C	G	G	A	G	C	T
2	神农华桑	C	T	G	A	T	A	A	C	G	G	A	G	C	T
3	毛叶奶桑	C	T	G	A	T	A	A	C	G	G	A	G	C	T
4	四川华桑	C	T	G	A	T	A	A	C	G	G	A	G	C	T
5	四川长果桑	C	T	G	A	T	A	A	C	G	G	A	G	C	T
6	咸丰长穗桑	C	T	A	A	T	G	A	G	G	G	A	G	C	T
7	利川长穗桑	C	T	A	A	T	G	A	G	G	G	A	G	C	T
8	钦州长果桑	C	T	A	A	T	A	A	C	G	G	A	G	C	T
9	龙须桑	C	T	A	A	A	A	A	C	T	G	C	G	C	T
10	剑持	C	T	A	A	A	A	A	C	T	G	C	G	C	T
11	小冠桑	C	T	A	A	A	A	A	C	T	G	C	G	C	T
12	和田白桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	C	G	C	T
13	龙桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	C	G	C	T
14	湖北蒙桑 4 号	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	C	G	C	T
15	昆明白桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	C	G	C	T
16	斯里兰卡 1 号	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	C	G	C	T
17	湖北蒙桑 3 号	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	C	G	C	T
18	神农架鸡桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	A	G	C	T
19	广东大 10	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	A	G	C	T
20	神农架山桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	A	G	C	T
21	四川鬼桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	A	G	C	T
22	雅安白桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	A	G	C	T
23	裂叶火桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	A	G	C	T
24	广东荆桑	C	T	A	A	T	A	A	C	T	G	A	G	C	T
25	新疆黑桑	G	C	A	G	T	A	T	C	G	A	A	A	T	G
26	重庆枸树	G	C	G	G	C	C	T	C	G	A	A	A	T	G

3 讨论

3.1 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列长度、G + C 含量与其他研究的比较

本研究中 12 个特色桑 ITS 间隔区(包括 5.8S)全长为 576 ~ 590 bp, G + C 含量为 59.38% ~ 60.17%; TrnL-F 间隔区(包括 TrnL 内含子)全长为 920 ~ 923 bp, G + C 含量为 34.02% ~ 34.24%; rps16 内含子全长为 929 ~ 947 bp, G + C 含量为 32.51% ~ 33.62%。关于桑属这 3 个片段,报道较少。史全良等^[26]最初报道了蒙桑 *M. mongolica* ITS 长度为 558 bp, G + C 含量平均 61.11%。赵卫国等^[27]2002 年报道了育 71-1、桑莲 TrnL-F 基因间隔区为 414 ~ 417 bp(没有包括 TrnL 内含子), G + C 含量为 35.88%; 2004 年报道了纳溪桑、牛耳桑、珙县黑油桑、纹契桑、伦敦 40 号、剑持、德江 10 号、吉蒙桑、有毛岩桑、T11、黔鄂桑 1 号、贵 14 号、插桑等品种 ITS 长度分别为 558 bp、550 bp、550 bp、561 bp、549 bp、550 bp、549 bp、561 bp、551 bp、552 bp、554 bp、550 bp、551 bp, G + C 含量分别为 58.79%、59.08%、59.49%、59.55%、59.40%、53.70%、59.77%、59.38%、59.57%、59.46%、59.22%、59.73%、59.57%^[28]。汪伟

等^[29-30]报道了广东桑 *M. atropurpurea*、华桑 *M. cathayana*、瑞穗桑 *M. mizuho*、白桑 *M. alba*、长穗桑 *M. wittorum*、蒙桑 *M. mongolica*、暹罗桑 *M. rotundiloba*、鬼桑 *M. mongolica* var. *diabolica*、鸡桑 *M. australis*、鲁桑 *M. multicaulis* 等材料 TrnL-F 基因间隔区序列长度为 534 ~ 561 bp(没有包括 TrnL 内含子), G + C 含量为 33.89%。rps16 基因内区序列长度 887 ~ 922 bp, G + C 含量为 32.6%。陈仁芳等^[31-32]报道了桑属植物 ITS 长度为 576 ~ 590 bp, G + C 含量为 59.55% ~ 62.25%; TrnL-F 基因间隔区(包括 TrnL 内含子)序列长度 920 ~ 924 bp, G + C 含量为 34.13%, rps16 基因内区序列长度为 923 ~ 929 bp, G + C 含量为 32.72%。与本研究均存在一定差异,这可能是材料不同造成的。

3.2 特色桑遗传距离、信息位点分析

本研究发现除剑持、咸丰长穗桑、钦州长果桑、小冠桑与其他材料有一定遗传距离外,龙桑、斯里兰卡 1 号、雅安白桑、和田白桑、广东大 10、龙须桑、湖北蒙桑 4 号与其他材料之间遗传距离很近,其中与大部分遗传距离为 0,神农华桑与荣经川桑、云南毛叶奶桑、四川花叶华桑、四川长果桑遗传距离也为 0,说明 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列变异位点太少。序

列信息变异位点分析仅 14 个, 占总位点数 0.5564%。且信息位点主要发生在外类群及新疆黑桑。14 个位点中, ITS 区域 9 个, TrnL-F 区域 4 个, rps16 区域 1 个。由此认为 TrnL-F、rps16 片段分析桑属的系统进化关系信息位点太少。这与陈仁芳等^[31-32]、董若铖等^[40]的研究结论一致。在桑属的分子分类学研究上, 可先用 ITS 片段分出大致的分类框架, 再选用其他方法细分。

3.3 ITS、TrnL-F 和 rps16 序列在分析桑属亲缘关系中的不足

ITS、TrnL-F 和 rps16 序列均为基因间隔区或内含子非编码区, 受选择的压力较小, 进化速率较快, 多用于被子植物属、种、种系的亲缘关系分析。但本研究分支图将蒙桑与白桑, 山桑、广东桑、瑞穗桑、鸡桑分在一起, 但蒙桑、鸡桑的特征、特性、地理分布与白桑、山桑明显不同^[41], 在桑属的分类上均作为种级单位分出, 已无争议。因此这 3 个片段在分析桑属亲缘关系时还有不足之处。这一结论, 在上一节也从遗传距离、信息位点的角度给予了讨论, 有待深入研究。

参考文献

- [1] 腾崇德. 多效益树种——龙桑[J]. 山西林业科技, 1997, 12(2): 17
- [2] 贺春燕. 甘肃中部半干旱区龙桑引种观察及嫁接试验[J]. 甘肃农业科技, 2007(9): 13-15
- [3] 薛忠民. 几个园林桑树品种的培育与管理[J]. 北方蚕业, 2004, 25(3): 47-48
- [4] 余茂德, 敬成俊, 王卓伟, 等. 垂枝桑枝条下垂的遗传分析初报[J]. 蚕业科学, 1999, 19(2): 9-10
- [5] 王登成, 陈仁芳. 三峡地区发现珍稀桑种——多果长穗桑[J]. 蚕桑通报, 1989(2): 64
- [6] 陈仁芳, 陈祥平, 范小敏, 等. 基于 ITS 分析云南光叶桑和钦州长果桑在桑属中的亲缘关系及分化时间[J]. 蚕业科学, 2012, 38(1): 2-7
- [7] 陈仁芳, 柯益富, 余茂德, 等. 桑属 (*Morus*) 植物扦插发根性调查[J]. 蚕学通讯, 1992(4): 9-11
- [8] Alvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference[J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 29: 417-434
- [9] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny[J]. Ann Mol Bot Garden, 1995, 82: 247-277
- [10] Bellarosa R, Simeone M C, Papini A, et al. B. Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp. [J]. Mol Phylogenet Evol, 2005, 34: 355-370
- [11] Kay K M, Reeves P A, Olmstead R G, et al. Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Costaceae): evidence from nrDNA ITS and ETS sequences[J]. Am J Bot, 2005, 92: 1899-1910
- [12] Asmussen C B, Chase M W. Coding and noncoding plastid DNA in palm systematics. American[J]. J Bot, 2001, 88(6): 1103-1117
- [13] Bellstedt D U, Linder H P, Harley E H. Phylogenetic relationships in *Disa* based on non-coding trnL-trnf chloroplast sequences: evidence of numerous repeat regions[J]. Am J Bot, 2001, 88(11): 2088-2100
- [14] Stech M, Quandt D, Frey W. Molecular circumscription of the bornworts (anthocerotophyta) based on the chloroplast DNA trnL-trnf region[J]. J Plant Res, 2003, 116: 389-398
- [15] 田欣, 李德铤. DNA 序列在植物系统学研究中的应用[J]. 云南植物研究, 2002(24): 170-184
- [16] Vinnersten A, Recves G. Phylogenetic relationships within cokiaceae[J]. Am J Bot, 2003, 90(10): 1455-1462
- [17] Berry P E, Hipp A L, Wurdack K J, et al. Molecular phylogenetics of the giant genus croton and tribe crotonae (*Euphorbiaceae sensu stricto*) using ITS and trnL~trnf DNA sequence data[J]. Am J Bot, 2005, 92(9): 1520-1534
- [18] Downie S R, Katz-downie D S. Phylogenetic analysis of chloroplast rps16 intron sequences reveal relationships within the woody southern African apiaceae subfamily apioidae[J]. Can J Bot, 1999, 77: 1120-1135
- [19] Kress W J, Liu A Z, Newman M, et al. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of ginger[J]. Am J Bot, 2005, 92(1): 167-178
- [20] 魏玉杰, 张金文, 何庆祥, 等. 不同生态区罂粟种质的遗传多样性 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 239-243
- [21] 高山, 许端祥, 林碧英, 等. 38 份瓠瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(4): 396-400
- [22] 刘艳华, 牟建民, 王志德, 等. 分子标记技术在烟草遗传育种中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 118-122
- [23] 杨庆文, 张万霞, 时津霞, 等. 广东高州普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff) 的遗传多样性和居群遗传分化研究[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(4): 315-319
- [24] 竺利波, 顾万春, 李斌. 花灌木种质资源及其遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(2): 240-245
- [25] 吴元立, 易干军, 周碧容, 等. 荔枝与龙眼种质资源研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(4): 498-502
- [26] 史全良, 赵卫国. 桑树 ITS 序列测定及特点的初步分析[J]. 蚕业科学, 2001, 27(2): 140-142
- [27] 赵卫国, 张志芳, 潘一乐, 等. 桑树 TrnL-F 基因间隔区序列的特点及分析[J]. 蚕业科学, 2002, 28(2): 38-42
- [28] 赵卫国, 潘一乐, 张志芳, 等. 桑属植物 ITS 序列研究与系统发育分析[J]. 蚕业科学, 2004, 30(1): 11-14
- [29] 汪伟, 王兴科, 朱昱苹, 等. 基于 rps16 内含子序列的桑属分子系统学研究[C]// 镇江: 江苏省遗传学会第七届二次代表大会暨学术研讨会论文摘要汇编, 2008
- [30] 汪伟, 王兴科, 朱昱苹, 等. 基于 trnL 内含子序列的桑属植物分子系统学初探[J]. 蚕业科学, 2008, 34(2): 100-103
- [31] 陈仁芳, 余茂德, 刘秀群, 等. 桑种质资源 ITS 序列与系统进化分析[J]. 中国农业科学, 2010, 4(9): 1771-1781
- [32] 陈仁芳, 张泽, 唐洲, 等. 桑属 ITS、trnL-F、rps16 序列与进化分析[J]. 中国农业科学, 2011, 4(8): 1553-1561
- [33] Weising K, Nybom H, Wolff K, et al. DNA fingerprinting in plants and fungi[M]. Florida: CRC Press, 1995: 50-54
- [34] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. San Diego: Academic Press Inc, 1990: 315-322
- [35] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, et al. Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Mol Biol, 1991, 17: 1105-1109
- [36] Shaw J, Lickey E B, Beck J T, et al. The tortoise and the hare II. Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis[J]. Am J Bot, 2005, 92: 142-166
- [37] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution[J]. Bioinformatics, 1998, 14: 817-818
- [38] Librado P, Rozas J. DnaSP v. 5. 10. 00 v. 5. 10. 005: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 5: 1451-1452
- [39] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. Bioinformatics, 2001, 17: 754-755
- [40] 董若铖, 陈祥平, 范小敏, 等. 四川几个特色桑品种 ITS 序列与亲缘关系分析[J]. 四川蚕业, 2012(2): 3-7
- [41] 陈仁芳. 桑属系统学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010