

柳树 DNA 条形码的筛选与鉴定研究

郑纪伟,何旭东,隋德宗,王保松

(江苏省林业科学研究院,江苏 南京 211153)

摘要:柳树具观赏、生物修复、生物能源等多种功能,对其开展 DNA 条形码评估在种质资源保护和利用方面具有非常重要的应用价值。通过对柳树样品进行 ITS、ITS2、*matK*、*rbcL* 和 *rpoCl* 片段扩增和测序,结合 GenBank 数据,共获得柳树 22 个种,63 份样品共计 396 条序列。比较了 5 个 DNA 片段的通用性、序列特征、种内和种间变异,并基于 Best Match (BM)、Best Close Match (BCM)、BLAST 及 Neighbor Joining (NJ) 4 种方法评估 DNA 条形码在柳树中的鉴定能力。结果表明,5 个 DNA 条形码中,ITS 在柳树种扩增效率和测序成功率高,种内和种间遗传变异明显,鉴定效率最高,建议作为首选的单位点 DNA 条形码;3 个条形码组合中,ITS+ITS2+*rbcL* 鉴定成功率最高,为 78.16%,4 个 DNA 条形码组合中,ITS+ITS2+*matK*+*rbcL* 物种鉴别成功率最高,为 88.28%,建议 ITS+ITS2+*matK*+*rbcL* 作为柳树分子鉴定最优条形码组合。

关键词:柳树; DNA 条形码; 筛选; ITS; 分子鉴定

中图分类号:Q755;S792.12

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2024.04.003

Screening and identification of DNA barcodes in willow

Zheng Jiwei, He Xudong, Sui Dezong, Wang Baosong

(Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211135, China)

Abstract: DNA barcoding evaluation of willow is of great application value in germplasm resource protection and utilization, as willow showing multifunctional, integrating ornament, bioremediation and bioenergy. Through the amplification and sequencing of ITS, ITS2, *matK*, *rbcL* and *rpoCl* fragments of willow samples, combined with GenBank data, we obtained 396 sequences from 22 species of willow. The comparisons of effective sequence ratios, characteristics of sequences, divergence of intra- and inter-varieties among the five DNA fragments had been performed to evaluate the recognition ability of DNA barcodes by using four methods as Best Match (BM), Best Close Match (BCM), BLAST and Neighbor Joining (NJ). The results showed that ITS, among the 5 DNA barcodes, had high amplification efficiency and sequencing success rate, obvious intraspecific and interspecific genetic variation, and the highest identification efficiency in willow species. Therefore, it was recommended to be the preferred unit point DNA barcode. Among the 3 barcode combinations, the success rate of ITS+ITS2+*rbcL* identification was the highest (78.16%) while among the 4 DNA barcode combinations, the success rate of ITS+ITS2+*matK*+*rbcL* identification was the highest (88.28%). Thus, it is suggested that ITS+ITS2+*matK*+*rbcL* be the best barcode combination for molecular identification of willow.

Key words: *Salix*; DNA barcode; Screening; ITS; Molecular identification

全世界有柳树 500 余种,集中分布于北半球温带地区。中国有柳树野生种 257 个,变种 122 个,变型 33 个^[1]。柳树是中国优美的园林观赏和高效的生物修复树种。在北美和欧洲,一些灌木柳被广泛

用作可再生和可持续的生物能源材料^[2]。柳树为雌雄异株,种间种内均容易杂交,种间杂交频率较高,杂交可能模糊物种之间的边界,且后代表现出高度可变的形态^[3-4]。因此,通过表型性状来进行

收稿日期:2024-05-19;修回日期:2024-06-27

基金项目:江苏省林业科学研究院青年基金项目“基于 DNA 条形码技术的柳树分子鉴定研究”(JAF-2016-01);江苏省林业科技创新与推广项目“江苏耐盐乡土林木树种培育长期科研基地”(LYKJ[2021]08);江苏省林业科学研究院自主科研项目“柳树专用新品种选育”(ZZKY202101)

作者简介:郑纪伟(1986-),男,河南洛阳人,高级工程师,硕士。主要研究方向为林木遗传育种。E-mail:zjw932333@163.com

柳树系统发育与分类学研究极其困难。截至目前,针对柳树已有多个分类系统的版本发布,但进一步分类一直在修订中^[5]。

准确的物种鉴定对资源保护和利用具有重要意义,然而,被子植物类群中如樟科(Lauraceae)^[6]、小檗属(*Berberis*)^[7]、榕属(*Ficus*)^[8]、柳属(*Salix*)^[9]、杜鹃花属(*Rhododendron*)^[10]等在分类上十分复杂。同时,在传统形态学分类局限性和分类学人才队伍锐减的双重压力下,准确的物种分类鉴定工作将迎来巨大挑战。DNA 条形码是生物体内普遍存在具有种内稳定保守性和种间遗传变异的较短且标准化的 DNA 片段,DNA 条形码鉴定技术不受个体形态特征限制和发育阶段影响,具有操作简单和准确性高等优点,常用于物种分子鉴定^[11],对加速物种分类学与生物地理学的保护和可持续发展具有重要意义^[12]。此技术已应用于龙脑香科(Dipterocarpaceae)^[13]、葡萄属(*Vitis*)^[14]、梭梭属(*Haloxylon*)^[15]等木本植物的物种分类鉴定研究。

目前,柳树中主要利用 SSR 分子标记技术对品种进行区分和亲缘关系分析,与形态学标记相比,更准确、方便和直观^[16-17]。而利用 DNA 条形码技术进行柳树系统发育等方面的研究有少量报道,且多基于单条形码研究,且研究材料的选择具有区域局限性^[18]。因此,本研究以柳树国内外 22 个种 63 个个体为材料,结合 GeneBank 柳属 DNA 条形码序列数据,筛选适于柳树分子鉴定的最佳 DNA 条形码及条形码组合,为柳树种质资源的保护利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料定植于江苏省林业科学研究院柳树种质资源圃,22 个种,每种个体 1—5 个,共 63 份样品(见表 1),采集幼嫩叶片,-80 ℃ 保存备用。同时,从 GenBank 下载柳树 ITS, ITS2, *matK*, *rbcL*, *rpoCl* 序列 119 条(见表 2)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用天根生化科技(北京)有限公司试剂盒(DP305)提取柳树叶片总 DNA,使用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.2.2 PCR 扩增 11 个候选 DNA 条形码引物序列信息如表 3,PCR 采用 30 μL 反应体系,包括 Taq

PCR mix15 μL,前后引物各 0.9 μL,模板 1 μL, ddH₂O12.2 μL。PCR 扩增程序参考郑纪伟硕士毕业论文第三章^[19],94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 1.5 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;12 ℃ 保存。委托上海凌恩生物科技有限公司进行双向测序。

表 1 试验材料

| 序号 | 物种 | 个体数量 |
|----|---|------|
| 1 | 欧洲红皮柳(<i>S. purpurea</i>) | 5 |
| 2 | 钻石柳(<i>S. eriocephala</i>) | 5 |
| 3 | 杞柳(<i>S. integra</i>) | 5 |
| 4 | 宫布氏柳(<i>S. miyabeana</i>) | 4 |
| 5 | 黄花柳(<i>S. caprea</i>) | 3 |
| 6 | 蒿柳(<i>S. viminalis</i>) | 2 |
| 7 | 簸箕柳(<i>S. suchowensis</i>) | 2 |
| 8 | 银柳(<i>S. leucopithecia</i>) | 2 |
| 9 | 细柱柳(<i>S. gracilistyla</i>) | 2 |
| 10 | 灰柳(<i>S. cinerea</i>) | 2 |
| 11 | 龙江柳(<i>S. sachalinensis</i>) | 1 |
| 12 | 二色柳(<i>S. alberti</i>) | 1 |
| 13 | 毛枝柳(<i>S. dasyclados</i>) | 1 |
| 14 | 黄柳(<i>S. gordejewii</i>) | 1 |
| 15 | 北沙柳(<i>S. psammophila</i>) | 1 |
| 16 | 新紫柳(<i>S. Neowilsonii</i>) | 1 |
| 17 | 垂柳(<i>S. babylonica</i>) | 5 |
| 18 | 旱柳(<i>S. matsudana</i>) | 5 |
| 19 | 龙爪柳(<i>S. matsudana</i> f. <i>tortuosa</i>) | 5 |
| 20 | 腺柳(<i>S. chaenomeloides</i>) | 4 |
| 21 | 白柳(<i>S. alba</i>) | 1 |
| 22 | 钻天柳(<i>Chosenia arbutifolia</i>) | 5 |
| 合计 | | 63 |

1.2.3 数据处理 利用 cap3 软件进行序列拼接、人工校对及低质量序列和两端引物区的去除。种内种间的遗传变异分析和遗传距离计算分别采用软件 DNAsp5.10 和 MEGA 7.0(K2P 模型),利用 R 包:MASS 中的函数 wilcoxtest 进行秩和检验。采用 Taxon DNA 软件中的 BM(Best Match)和 BCM(Best Close Match)两种方法分析鉴定成功率。使用 BLAST 软件,将相同位点的百分比(identical sites)作为量化标准,如果相同物种的 identical sites 值都大于与其他所有物种个体间的 identical sites 值,那么认为这个物种的序列得到了准确鉴定。使用 Geneious 9 软件构建邻接(NJ)树,设置 bootstrap 值为 1 000。

表 2 GenBank 下载序列信息

| 条形码 | 物种 | 登录号 | 小计 |
|-------|---|--|----|
| ITS | <i>S. alba</i> 、 <i>S. babylonica</i> 、 <i>S. caprea</i> 、 <i>S. cinerea</i> 、 <i>S. eriocephala</i> 、 <i>S. matsudana</i> 、 <i>S. pentandra</i> 、 <i>S. viminalis</i> 、 <i>C. arbutifolia</i> | (KX008758、JN115049、KX008757)、(KX008770、KX008769、AB685282)、(MG772956、KX008794、AB685284)、(KX008804、AB685287)、(KX008823、KX008822、KX008821)、(KF209230、KF209227、KF209223)、(KX008897、KX008896)、(KX008912、KX008910)、(KX008957、KX008956)、(KX008960) | 24 |
| | <i>S. alba</i> 、 <i>S. aurita</i> 、 <i>S. caprea</i> 、 <i>S. cinerea</i> 、 <i>S. eriocephala</i> 、 <i>S. fragilis</i> 、 <i>S. integra</i> 、 <i>S. pentandra</i> 、 <i>S. purpurea</i> 、 <i>S. triandra</i> 、 <i>S. viminalis</i> 、 <i>S. tetrasperma</i> | (KX166718、KX165673)、(KX165711、KX166093)、(KX166538、KX166104)、(KX167330、KX166664)、(MG236653)、(KX166539)、(LC365296)、(KX166542、KX166541、KX165869)、(KX166371、KX166370、KX165874)、(KX166373、KX165472)、(KX166372、KX165889)、(MG256306) | 22 |
| matK | <i>S. alba</i> 、 <i>S. babylonica</i> 、 <i>S. caprea</i> 、 <i>S. chaenomeloides</i> 、 <i>S. cinerea</i> 、 <i>S. eriocephala</i> 、 <i>S. matsudana</i> 、 <i>S. purpurea</i> 、 <i>S. sachalinensis</i> 、 <i>S. viminalis</i> 、 <i>C. arbutifolia</i> | (HQ593425、KX016119、KM001954)、(EU749390、KX016131、KC415383)、(KX229989、JN893911)、(LC219316、KC415391)、(KX229992、JN895668、JN895010)、(KJ841001、KX016184、KM002124)、(MG221033、KF209263、KC415409)、(MG221132、JN893908)、(FR694990)、(KX016320、KM002476、JN893913)、(KX016323、KC415382) | 27 |
| rbcL | <i>S. alba</i> 、 <i>S. babylonica</i> 、 <i>S. caprea</i> 、 <i>S. chaenomeloides</i> 、 <i>S. cinerea</i> 、 <i>S. eriocephala</i> 、 <i>S. matsudana</i> 、 <i>S. nigra</i> 、 <i>S. purpurea</i> 、 <i>S. viminalis</i> 、 <i>C. arbutifolia</i> | (KJ204399、HQ590254、KX016332)、(EU676998、KX016344)、(KJ204400、KX016369、JN892173)、(LC219097)、(MG249791、KX016378)、(EU677002、EU677001)、(MG773038、MG249161)、(MG245877、KX016459)、(MG249765、JN891726)、(MG247569、KX016533、JN891728)、(KX527039、KJ101449) | 24 |
| rpoC1 | <i>S. alba</i> 、 <i>S. babylonica</i> 、 <i>S. eriocephala</i> 、 <i>S. glauca</i> 、 <i>S. lucida</i> 、 <i>S. nigra</i> 、 <i>S. scouleriana</i> 、 <i>S. serissima</i> 、 <i>S. serpyllifolia</i> 、 <i>S. sutchensis</i> 、 <i>S. viminalis</i> | (HQ594119、KM002653、JN114997)、(EU750301)、(EU750305、KM002719)、(KM002815、KM002726)、(HQ594122、KM002756)、(HQ594123、KM002760)、(KM002789、KM002788)、(KM002791、KM002790)、(KU673505、KU673504)、(KM002805、KM002803、KM002800)、(KM002813) | 22 |

表 3 PCR 扩增引物信息

| 条形码 | 引物序列(5'-3') | 预期长度 | 参考文献 |
|-----------|---|------|--------|
| ITS | F:CGTAACAAGGTTTCCGTAGG;R:TGCTTAAACTCAGCGGCTAG | 608 | |
| matK | F:TAATTTACGATCAATTCATTC;R:GTACTTTTATGTTTACGAGC | 874 | [5] |
| rbcL | F:ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC;R:GTAAATCAAGTCCACCCRCG | 553 | |
| rpoC1 | F:GTGATACACTTCTTGATAATGG;R:CCATAAGCATATCTTGAGTTGG | 471 | [9] |
| trnH-psbA | F: GCGCGATGGTGGATTACAAATC;R:GTTATGCATGAACGTAATGCTC | 238 | |
| rpoB | F:ATGCAACGTCAAGCAGTTCC;R:CCGTATGTGAAAAGAAGTATA | 358 | |
| atpF-atpH | F:ACTCGCACACACTCCCTTTCC;R:GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT | 567 | |
| psbK-psbI | F:TTAGCCTTTGTTTGGCAAG;R:AGAGTTTGAGAGTAAGCAT | 470 | [11] |
| ITS2 | F:ATGCGATACTTGGTGTGAAT;R:GACGCTTCTCCAGACTACAAT | 450 | [20] |
| P-DSH10 | F: TACAAAAGCATTAAAGATCACCAGT;R: GGAGCACACTTATCAATAAAACTAC | 804 | [21] |
| P-DSH28 | F: TATGGA AAAAGTTAGGCCAAGAGGA;R: CAAAGAGCAGAAGGCTATATCAAG | 222 | [22] |

2 结果与分析

2.1 候选条形码扩增和测序成功率

从杨柳科近缘种中选取 ITS、ITS2、*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*、*rpoB*、*rpoC1*、*atpF-atpH*、*psbK-psbI*、P-DSH10 及 P-DSH28 等 11 条 DNA 候选条形码,以 22 个柳树(每种个体 1 个)作为模版进行 PCR 扩增。如表 4 所示,ITS、ITS2、*matK*、*rbcL* 及 *rpoC1* 扩增成功率达到 100%,其余 6 个片段的扩增成功率较低,不进行后续测序分析。测序结果显示,ITS2 的测序成功率最高,为 100%,*rpoC1* 次之,为 98.4%,最低的 *matK* 为 86.9%(见表 4)。本研究中的 ITS、ITS2、*matK*、*rbcL*、*rpoC1* 等 5 个片段能够获得高质量的扩增序列,有效片段获得率(扩增成功率和测序成功率的乘积)高。

表 4 条形码扩增和测序成功率

| 条形码 | 扩增成功率/% | 测序成功率/% | 有效序列比例/% |
|-------|---------|---------|----------|
| ITS | 100 | 95.1 | 95.1 |
| ITS2 | 100 | 100 | 100 |
| matK | 100 | 86.9 | 86.9 |
| rbcL | 100 | 93.4 | 93.4 |
| rpoC1 | 100 | 98.4 | 98.4 |

2.2 序列特征分析及种内种间遗传变异比较

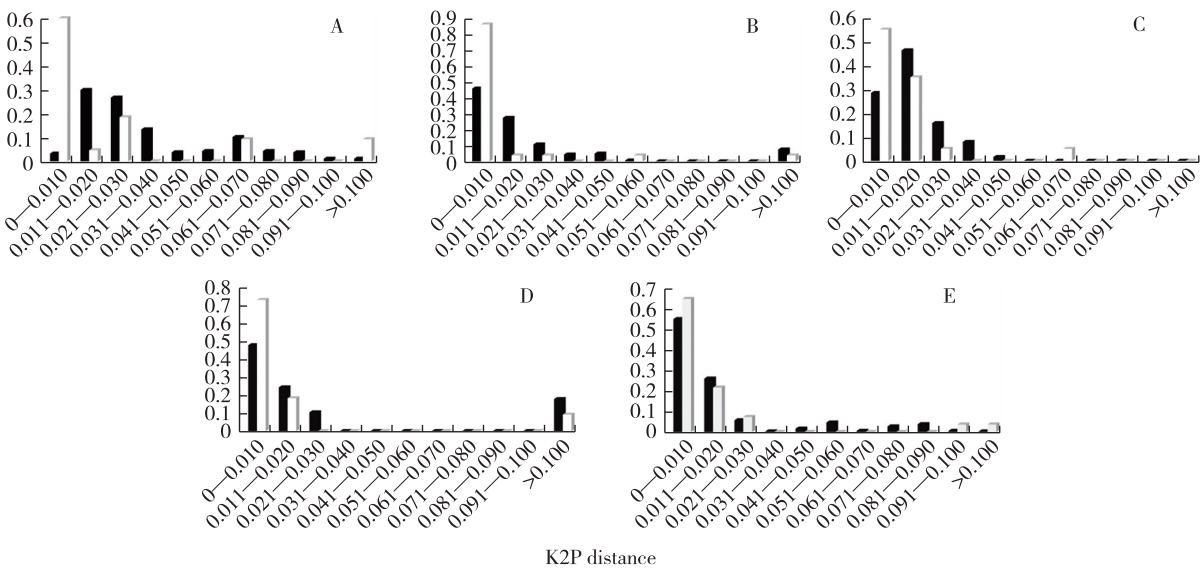
本研究所有个体共获得序列 396 条,包括 ITS 片段 80 条、ITS2 片段 81 条、*matK* 片段 77 条、*rbcL* 片段 78 条和 *rpoC1* 片段 80 条。经过序列比对,获得突变总数分别为 437,171,7,447 和 120,GC 含量分别为 67.0%、65.7%、28.8%、46.0% 和 41.5%,单倍型多样性分别为 0.922,0.895,0.602,0.789 和 0.742(见表 5)。

| 表 5 序列特征信息 | | | | | | | | |
|------------|------|-------|-------|------|---------|-------|--------|----------|
| 条形码 | 序列数量 | 总位点数 | 变异位点数 | 突变总数 | GC 含量/% | 单倍型数量 | 单倍型多样性 | 核苷酸多样性 |
| ITS | 80 | 805 | 332 | 437 | 67 | 25 | 0.922 | 0.040 74 |
| ITS2 | 81 | 728 | 153 | 171 | 65.7 | 22 | 0.895 | 0.024 26 |
| matK | 77 | 1 468 | 7 | 7 | 28.8 | 6 | 0.602 | 0.004 47 |
| rbcL | 78 | 1 199 | 332 | 447 | 46 | 20 | 0.789 | 0.037 54 |
| rpoC1 | 80 | 636 | 116 | 120 | 41.5 | 19 | 0.742 | 0.001 68 |

轶和检验结果如表 6 所示,5 个条形码在种内两两比较中, P 值均大于 0.05,变异不显著;种间两两比较中,ITS2 和 ITS,ITS 和 *matK*,ITS 和 *rbcL*,ITS 和 *rpoC1*, P 值<0.05,遗传变异差异显著,变异大小为 ITS2>ITS,ITS>*matK*,ITS>*rbcL*,ITS>*rpoC1*,除此之外,其他条形码序列之间种间差异不显著(如图 1)。

| 条形码 | W+ | | W- | | P 值 | | 数量 Number | |
|---------------|----|----------|----|----------|---------|---------------------------|-----------|-----|
| | 种内 | 种间 | 种内 | 种间 | 种内 | 种间 | 种内 | 种间 |
| ITS2_vs_ITS | 87 | 11 409 | 33 | 3 297 | 0.135 4 | 3.964×10^{-10} *** | 16 | 172 |
| ITS2_vs_matK | 52 | 3 936 | 39 | 2 850 | 0.684 8 | 0.135 | 13 | 121 |
| ITS2_vs_rbcL | 65 | 9 708.5 | 55 | 6 944.5 | 0.804 0 | 0.052 2 | 16 | 191 |
| ITS2_vs_rpoC1 | 79 | 9 434.5 | 41 | 7 585.5 | 0.302 8 | 0.201 5 | 16 | 191 |
| ITS_vs_matK | 76 | 8 716 | 29 | 600 | 0.153 1 | $<2.2\times10^{-16}$ *** | 15 | 137 |
| ITS_vs_rbcL | 98 | 11 844 | 38 | 6 301 | 0.129 7 | 0.000 261 3 *** | 17 | 191 |
| ITS_vs_rpoC1 | 80 | 13 302 | 56 | 4 276 | 0.561 9 | 1.139×10^{-9} *** | 17 | 191 |
| matK_vs_rbcL | 56 | 5 104.5 | 49 | 3 940.5 | 0.855 2 | 0.196 5 | 15 | 137 |
| matK_vs_rpoC1 | 96 | 4 661 | 40 | 3 985 | 0.155 0 | 0.438 1 | 18 | 137 |
| rbcL_vs_rpoC1 | 96 | 12 919.5 | 40 | 12 280.5 | 0.155 0 | 0.742 5 | 18 | 232 |

注: P 值小于 0.001 为差异极显著,用 *** 表示



注: A, B, C, D, E 分别为 ITS, ITS2, *matK*, *rbcL* 和 *rpoC1*; 横坐标: 遗传距离, 纵坐标: 百分比; ■ 种间, □ 种内

图 1 候选条形码在柳树种间及种内遗传距离的频率分布

2.3 候选条形码鉴定能力评估

利用 BM, BCM, BLAST 和 NJ 4 种方法分别对 5 个候选条形码物种水平的鉴定能力进行分析。结果显示, ITS 基因, 采用 BM, BCM, BLAST 及 NJ 方法分别获得 35.26%, 32.92%, 22.22% 和 4.5% 的鉴定成功率; 基于 4 种方法的 ITS2 基因鉴定成功率分别为 25.3%, 25.3%, 28.05% 和 3.70%; 基于 NJ 方法,

matK, *rbcL* 及 *rpoC1* 鉴定成功率均为 0, 而基于 BM, BCM 及 BLAST 方法, 鉴定成功率也均低于 ITS 和 ITS2 基因。总体来看, ITS, ITS2, *matK* 和 *rbcL* 基于 4 种评估方法获得了较为一致的分析结果, 基于 BM 法的鉴定成功率总体最高; 而 *rpoC1* 基于 Blast 方法鉴定成功率最高(如图 2)。

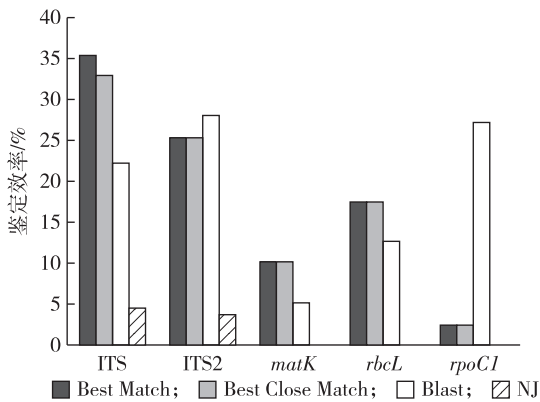


图 2 基于 4 种方法的条形码鉴定效率比较

2.4 不同条形码组合对柳树的物种分辨率

在 4 种方法中 BM 法的鉴定成功率最高,因此,以 BM 法数据为基础,统计不同条形码组合的物种鉴定成功率。结果(见表 7)显示,条形码两两组合的情况下,ITS + ITS2 的鉴定成功率最高,为 60.66%,ITS + *rbcL* 次之,为 52.86%,ITS + *matK* 最低,为 45.48%;3 个条形码组合,ITS+ITS2+*rbcL* 最高,为 78.16%,最低为 ITS+*matK*+*rbcL*,鉴定成功率为 62.98%;4 个条形码最佳组合为 ITS+ITS2+*matK*+*rbcL*,物种鉴别成功率达 88.28%;本研究中 5 个条形码组合之后,物种鉴别成功率虽然高达 90.71%,但是考虑 *rpoC1* 序列在 BM 方法中的物种鉴别成功率(2.43%)显著低于 Blast 方法(27.16%),因此,ITS+ITS2+*matK*+*rbcL* 的条形码组合为柳树分子鉴定的最佳条形码组合。

表 7 基于 BM 方法的条形码组合物种鉴定成功率

| 序号 | 条形码组合 | 物种分辨率/% |
|----|--------------------------|---------|
| 1 | ITS+ITS2 | 60.66 |
| 2 | ITS+matK | 45.48 |
| 3 | ITS+rbcL | 52.86 |
| 4 | ITS+ITS2+matK | 70.78 |
| 5 | ITS+ITS2+rbcL | 78.16 |
| 6 | ITS+matK+rbcL | 62.98 |
| 7 | ITS+ITS2+matK+rbcL | 88.28 |
| 8 | ITS+ITS2+matK+rbcL+rpoC1 | 90.71 |

3 讨论

物种间核苷酸变异的 GC 含量是鉴定植物物种的关键因素,GC 含量越高,Tm 差异越大。开花植物的 ITS 序列较短,一般在 187—298 bp,杨柳科植物的 ITS 序列长度为 210—223 bp,杨柳科 2 个 ITS

区的 GC 含量均较高,在 65.8%—71.2% 之间变化^[22]。本研究结果显示,ITS 区域是变异最大的区域,其变异数和核苷酸多样性最高(见表 2);ITS 和 ITS2 的 GC 含量分别为 67% 和 65.7%,位于 5 个候选条形码的前两位,这可能与核基因序列有 GC 含量偏好性和叶绿体基因有 AT 含量偏好性有关^[23]。

ITS 被认为是许多分类学类群的强大 DNA 条形码区域,因为它的快速进化能够区分相近、同属物种。ITS 具有通用性、简化性、高拷贝数、种间变异性和种内一致性等优点,已被用作识别多种植物的通用条形码^[24-25]。本研究中,ITS 扩增成功率、测序成功率均较高,采用 BM,BCM,BLAST 及 NJ 4 种方法的鉴定成功率在 5 个候选条形码中最高,因此 ITS 可作为柳树分子鉴定的首选通用 DNA 条形码。ITS2 是 ITS 中介于 5.8S rRNA 和 25S rRNA 之间的非编码核 DNA 片段,在变异、序列质量和高种间种内分化能力方面具有优势,可以在科、属和种水平上区分密切相关的分类群,有助于在更多样化的植物区系中识别同源体,但存在多拷贝,且协同进化和异质性还可能导致不准确或误导性的结果^[26]。本研究中,ITS 在 4 种鉴定方法中的成功率低于 ITS,但种内两两比较中,变异大于 ITS。相关研究结果也表明,ITS2 在柳树的分类鉴定上具有优势^[27]。

基于目前对基因组结构、核苷酸取代率和比率分布的变化,很难找到单一的适用于所有植物的 DNA 条形码^[28]。多位点 DNA 条形码组合更可取,是实现普适性、序列质量、鉴别性和成本之间权衡的一种实用的解决方案,比单个 DNA 条形码物种鉴别力更高,同时,多位点条形码具有结果相互验证和补充的优点^[29]。杨柳科植物中,广泛杂交比较普遍,细胞质捕获也被发现。因此,要揭示杨柳科植物的进化历史及准确分类鉴定,单种类型的 DNA 标记无法实现,需要 cpDNA 和 nrDNA 结合^[7]。本研究中,条形码组合鉴定能力评估结果显示,两两组合条件下,ITS 与 ITS2 组合,鉴定成功率最高为 60.66%,3 个条形码组合中,鉴定成功率最高为 78.16%,ITS+ITS2+*matK*+*rbcL* 的条形码组合,鉴定成功率最高为 88.28%。综合考虑,建议将 ITS + ITS2+*matK*+*rbcL* 作为柳树分子鉴定的首选条形码组合,能够提供更多遗传信息对柳树进行准确分类鉴定。

总之,无论从单位点还是多位点 DNA 条形码,与其他物种相比,柳树的鉴定成功率偏低,造成这

种结果有多方面原因。首先,柳树种间种内杂交都比较容易,而杂交使近缘种具有同源序列,又如辐射分化、多倍化等现象均可能是导致 DNA 条形码在柳树中分辨率低的原因。同时,物种水平的分辨率差异反映了所使用的基因标记数量和组合的差异。本研究选取了柳属 22 个种 63 个个体材料,结合 GenBank 数据库,最大限度的筛选柳树分子鉴定的通用 DNA 条形码,将为后续柳树种质资源鉴定、遗传多样性分析等方面的研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] 涂忠虞. 柳树育种与栽培[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1982:116-119.
- [2] TIAN X Y, ZHENG J W, JIAO Z Y, et al. Transcriptome sequencing and EST-SSR marker development in *Salix babylonica* and *S. suchowensis*[J]. Tree Genetics & Genomes, 2019;15(1):1-13.
- [3] WAGNER N D, HÖRANDL E, GRAMLICH S. RAD sequencing resolved phylogenetic relationships in European shrub willows (*Salix* L. subg. *Chamaetia* and subg. *Vetrix*) and revealed multiple evolution of dwarf shrub[J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(16): 8243-8255.
- [4] WAGNER N D, HE L, HÖRANDL E. Phylogenomic relationships and evolution of polyploid *Salix* species revealed by RAD sequencing data[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11:1077.
- [5] LAURON-MOREAU A, PITRE F E, ARGUS G W, et al. Phylogenetic relationships of american willows (*Salix* L., Salicaceae)[J]. PloS one, 2015, 10(9): e0138963.
- [6] PARMENTIER I, DUMINIL J, KUZMINA M, et al. How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees?[J]. PloS one, 2013, 8(4): e54921.
- [7] JONES L, TWYFORD A D, FORD C R, et al. Barcode UK: A complete DNA barcoding resource for the flowering plants and conifers of the United Kingdom[J]. Molecular Ecology Resources, 2021, 21(4): 2050-2062.
- [8] LIU Z F, CI X Q, LI L, et al. DNA barcoding evaluation and implications for phylogenetic relationships in Lauraceae from China[J]. PloS one, 2017, 12(4): e0175788.
- [9] TWYFORD A D. Testing evolutionary hypotheses for DNA barcoding failure in willows[J]. Molecular Ecology, 2014, 23(19): 4674-4676.
- [10] LI H Q, CHEN JY, WANG S, et al. Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in *Ficus* (Moraceae) of China[J]. Molecular Ecology Resources, 2012, 12(5): 783-790.
- [11] PERCY D M, ARGUS G W, CRONK Q C, et al. Understanding the spectacular failure of DNA barcoding in willows (*Salix*): Does this result from a trans-specific selective sweep? [J]. Molecular Ecology, 2014, 23(19): 1-20.
- [12] YAN L J, LIU J, MOLLER M, et al. DNA barcoding of *Rhododendron* (Ericaceae), the largest Chinese plant genus in biodiversity hotspots of the Himalaya-Hengduan Mountains[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 15(4): 932-944.
- [13] 胡建霖, 刘志芳, 慈秀芹, 等. DNA 条形码在热带龙脑香科树种鉴定中的应用[J]. 植物学报, 2019, 54(3): 350-359.
- [14] 宋慧芳, 刘海双, 杨义明, 等. 山葡萄种质资源 DNA 条形码通用序列的筛选[J]. 植物学报, 2017, 52(6): 723-732.
- [15] 孙芳芳, 聂迎彬, 马松梅, 等. 基于 ITS 和 cpDNA 序列的梭梭和白梭梭物种分化[J]. 林业科学, 2019, 55(3): 43-52.
- [16] 郑纪伟, 教忠意, 王保松, 等. 柳树新品种指纹图谱构建[J]. 江苏林业科技, 2020, 47(2): 1-5.
- [17] 何旭东, 郑纪伟, 孙冲, 等. 33 个杨柳品种指纹图谱构建[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(2): 35-42.
- [18] LESKINEN E, ALSTROM-RAPAPORT C. Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtiaceae: evidence from 5S, ITS1 and ITS2 of the rDNA[J]. Plant Systematics and Evolution, 1999, 215: 209-227.
- [19] 郑纪伟. 柳树转录组高通量测序及 SSR 标记开发研究[D]. 南京:南京林业大学, 2013.
- [20] KUZMINA M L, JOHNSON K L, BARRON H R, et al. Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library[J]. BMC Ecology, 2012, 12:25.
- [21] DU S H, WANG Z S, ZHANG J G. A novel set of single-copy nuclear DNA markers for the genetic study of Salicaceae[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(3): 4911-4917.
- [22] WANG Z S, DU S H, DAYANANDAN S, et al. Phylogeny reconstruction and hybrid analysis of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of multiple single-copy nuclear genes and plastid fragments[J]. PloS one, 2014, 9(8): e103645.
- [23] KUZOVKINA Y A, WEIH M, ROMERO M A, et al. *Salix*: botany and global horticulture [J]. Horticultural Reviews, 2008, 34: 447-489.
- [24] SELVARAJ D, SHANMUGHANANDHAN D, SARMA R K, et al. DNA barcode ITS effectively distinguishes the medicinal plant *Boerhavia diffusa* from its adulterants [J]. Genomics Proteomics Bioinform, 2012, 10:364-367.
- [25] CHEN S L, PANG X H, SONG J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA [J]. Biotechnology Advances, 2014, 32: 1237-1244.
- [26] ZHU S, LIU Q Z, QIU S M, et al. DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances [J]. Chinese Medicine, 2022, 17(1): 112.
- [27] 任伟超, 徐娇, 孙伟, 等. 基于 DNA 条形码的柳属植物系统发育研究[J]. 植物研究, 2021, 41(6): 896-903.
- [28] NEWMASTER S G, FAZEKAS A J, RAGUPATHY S. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach[J]. Canadian Journal of Botany, 2006, 84(3): 335-341.
- [29] 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 of the United States of America, 2005, 102(23): 836-974.