



DNA 序列在悬钩子属植物分子系统学研究中的应用进展

张 丽¹, 王小蓉^{1,2*}, 王 燕¹, 陈 清¹, 何 文¹

(1 四川农业大学 园艺学院, 四川雅安 625014; 2 四川农业大学 果蔬研究所, 成都 611130)

摘 要: 悬钩子属植物种类繁多, 类群复杂, 而且多为多倍体和杂种。该文就近年来国内外有关 DNA 序列在悬钩子属植物分子系统学研究中的应用现状和进展进行了综述, 并对中国悬钩子属植物系统发育研究进行了展望。研究认为: 叶绿体 DNA 序列多应用非编码区, 且多与 ITS 序列联合分析; 核基因组中 ITS 序列应用最为广泛, 主要用于研究悬钩子属空心莓组与木莓组的进化关系、栽培品种间亲缘关系及部分杂种和多倍体的起源等; 在该属植物中发现了 ITS 个体内多态性, 但未进行 ITS 假基因检测, 其系统学应用价值需重新评价; 低拷贝核基因只有 *GBSSI* 和 *LEAFY* 有相关应用。同时认为, 悬钩子属植物系统学研究中应用的 DNA 序列及研究类群均较少, 缺乏对整个悬钩子属全面而系统的研究。指出应进一步选择具有代表性的样本、筛选合适的 DNA 片段, 并结合形态学、孢粉学和细胞学等手段对中国悬钩子属植物系统关系进行深入研究。

关键词: 悬钩子属; DNA 序列; 系统发育; ITS 序列; 叶绿体 DNA; 低拷贝核基因

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Research Progress of Molecular Phylogenetic Analyses Based on DNA Sequence Data in *Rubus* L. (Rosaceae)

ZHANG Li¹, WANG Xiaorong^{1,2*}, WANG Yan¹, CHEN Qing¹, HE Wen¹

(1 College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; 2 Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: *Rubus* is a large and taxonomically complex genus consisting of hybrid and polyploid. In this review, we summarized and discussed the application of DNA sequences in the *Rubus* L. phylogenetic studies, mainly focus on their limitation and promising application prospect in the Chinese *Rubus*. Noncoding chloroplast DNA fragments combined with ITS sequence were frequently applied. ITS was the most widely applied sequence among the nDNAs. It has been used for clarifying the phylogeny between sections *Idaeobatus* and *Malachobatus*, illustrating genetic relationship among *Rubus* cultivars, and identifying the origin of hybrid and polyploid. Due to ITS polymorphism among individuals, it was necessary to detect putative pseudogenes. By contrast, low-copy nuclear genes were rarely applied except *GBSSI* and *LEAFY*. The phylogenetic relationships of some *Rubus* species remain unclear because of the deficiency of available DNA sequence and limitation of covered groups. Additionally, utilization of multi-specific DNA and more samples in phylogenetic applications probably has one bright future, along with the morphology, palynology, cytology and other means.

Key words: *Rubus* L.; DNA sequence; phylogeny; ITS sequence; chloroplast DNA; low-copy nuclear genes

收稿日期: 2013-10-19; 修改稿收到日期: 2013-12-23

基金项目: 国家自然科学基金(31272134)

作者简介: 张 丽(1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事果树种质资源与遗传育种。E-mail: zhangliqsc@163.com

* 通信作者: 王小蓉, 教授, 博士生导师, 主要从事果树种质资源与遗传育种。E-mail: wangxrtj@163.com

悬钩子属(*Rubus* L.)又名树莓属,隶属蔷薇科蔷薇亚科,是蔷薇科中一个大属,全世界有 700~1 000 种^[1]。中国是现代悬钩子属植物的重要分布中心之一,现有悬钩子属植物 201 种,98 变种,其中特有种 138 种,包含于 8 组 24 个亚组之中^[2-3]。树莓是悬钩子属植物中果实可食的栽培特色果树种类^[4]。中国野生树莓资源极其丰富,很多种质具有较大育种潜力^[5-7]。但长期以来,树莓所属的悬钩子属分类和系统发育关系还存在较大分歧^[8-9]。分类处理困难是悬钩子属类群存在的普遍现象,很多种的分类和系统位置都存在争议^[2-3,10-13],影响了对优良野生树莓种质的育种利用。

果用优良种质或特异树莓种质主要集中在空心莓组(Sect. *Idaeobatus* Focke)和木莓组(Sect. *Malachobatus* Focke),这两个组物种的系统发育关系和分类更是研究的焦点^[14-17],特别是椭圆悬钩子(*R. ellipticus* Smith)、栽秧泡[*R. ellipticus* var. *obcordatus* (Franch.) Focke]和红毛悬钩子(*R. pinfaensis* Lévl. et Vant.)的分类处理及系统位置的争议^[3,10-11,18-21]。茅莓(*R. parvifolius*)和插田泡(*R. coreanus*)也是很有育种潜力的优良野生树莓种质。多年来,我们实地调查发现了一系列形态介于茅莓和插田泡之间、呈现连续变异的居群,同时茅莓种内也存在各种形态变异丰富的居群,对这些变异类群的正确鉴定与分类也是当前面临的重要问题^[22-25]。此外,中国特有种峨眉悬钩子(*R. faberi*)与川莓(*R. setchuenensis*)、秀丽莓(*R. amabilis*)与光滑悬钩子(*R. tsangii*)、插田泡及其变种等在分类上仍较混乱^[18,20-21,26]。虽然前人从植物形态学、孢粉学、细胞学和分子生物学等角度对相关类群的系统关系进行了探讨^[7,19-21,25-30],但在揭示该属植物多倍体和杂种的起源以及复杂类群间进化关系上仍存在局限。

基于各种 DNA 序列信息的分子系统学是目前揭示生物各个类群系统发育规律和种类之间进化关系较理想的方式^[31-32]。因此,对于存在无融合生殖且杂交广泛的悬钩子属植物,DNA 序列的应用非常重要。本文对 DNA 序列在悬钩子属植物的系统发育和物种鉴定中的研究进展做一述评,并对其未来利用趋势以及系统学研究进行展望。

1 DNA 序列在悬钩子属系统学研究中的应用

目前,基于 DNA 序列的分子系统学研究已在悬钩子属各类群中展开,处理一些长期有争议或待

解决的系统进化问题。悬钩子属植物系统学研究中应用的 DNA 序列主要有:叶绿体 DNA 序列(*ndhF*、*rbcL*、*rpl16*、*trnL-F*、*trnS-G* 和 *trnK*)、核 DNA 序列(ITS)和低拷贝核基因(*GBSSI* 和 *LEAFY*)(表 1)。

1.1 叶绿体 DNA 序列在悬钩子属系统学中的应用

叶绿体 DNA,相对于核基因组分子量小,结构简单,序列保守,突变率较低,遗传相对稳定^[33-35]。其编码区和非编码区核苷酸进化速率的差异,能够为不同分类阶元的系统学研究提供丰富的变异来源^[36-37]。在悬钩子属植物系统学研究中,只有 *ndhF* 序列和 *rbcL* 序列作为单一序列应用,其他叶绿体 DNA 序列与核基因序列(ITS)联合应用。

ndhF 序列作为独立数据来源,为悬钩子属 *R. macraei* 和 *R. hawaiiensis* 的系统关系提供了有力的分子证据。*R. macraei* 和 *R. hawaiiensis* 形态特征相似,均属空心莓亚属 Subg. *Idaeobatus*,可能由同一祖先进化而来^[38]。Howarth 等^[39]利用 *ndhF* 序列构建的系统树表明,*R. macraei* 未与空心莓亚属其他种聚为一支,而 *R. hawaiiensis* 则位于空心莓亚属物种所在分支。Morden 等^[40]进一步分析表明 *R. macraei* 与悬钩子亚属 Subg. *Rubus* 物种聚为一支,且与 *R. ursinus* 显示为姐妹关系。上述结果表明,*R. macraei* 和 *R. hawaiiensis* 亲缘关系较远,形态特征相似可能由环境趋同进化引起,因此对于 *R. macraei* 的分类处理需重新斟酌。

叶绿体 DNA 为单亲遗传^[41],无法全面揭示悬钩子属植物杂交和异源多倍化等系统进化问题,且长度有限的单一序列能够提供的系统学信息较为有限^[42]。目前,在悬钩子属植物系统学研究中,叶绿体 DNA 序列多与核基因序列联合应用。董晓莉^[15]结合叶绿体 DNA 序列(*trnL-F*)和核基因(ITS)对中国西南地区悬钩子属系统关系展开研究,认为椭圆悬钩子和红毛悬钩子的关系较近,而与其变种栽秧泡关系较远,支持椭圆悬钩子与红毛悬钩子归并,栽秧泡 *R. ellipticus* var. *obcordatus* (Franch.) Focke 由椭圆悬钩子变种提升为种 *R. obcordatus* (Franch.) Thuan^[3]。

值得注意的是,叶绿体 DNA 序列在该属植物系统学研究中多应用非编码区(基因间区和内含子)。叶绿体非编码区受功能约束少,适用于悬钩子属种间及种下水平的系统关系重建。但在该属植物系统发育研究中应用的叶绿体非编码区进化速度或相对较慢(如 *trnL-F*),表现出较低水平的序列变异

及较少的系统信息^[15];或进化速率相对较快(如 *rpl16*),可能存在的平行突变、趋同突变等使排序困难,从而使该属一些物种关系得不到解决或存在支持率较低的现象^[43-44]。因此,应进一步选择适合悬钩子属植物系统学研究的叶绿体 DNA 片段,并结合多种 DNA 序列对该属系统关系展开研究。

1.2 核基因组 DNA 序列(ITS)应用广泛

核基因组中,ITS 序列在悬钩子属植物系统研究中应用最广泛。ITS 为双亲遗传,具有较快的变异速率和长度保守性,能够处理植物科内不同等级的系统发育与分类问题,为系统关系重建提供较好的支持^[45-48]。ITS 序列在悬钩子属植物中应用时多结合其他序列进行联合分析,被用于探究空心莓组与木莓组的进化关系、栽培品种间亲缘关系及杂种和多倍体的起源等问题。

空心莓组和木莓组集中了中国悬钩子属大部分种(约 170 种),同时也是果用优良树莓种质集中的两个组。Focke^[10-11]根据形态特征将悬钩子属分为 12 个亚属,并认为木本类群比草本类群进化,二倍体比多倍体进化,空心莓组较木莓组进化。而中国的分类系统却与之相反,陆玲娣和俞德浚^[2-3]将悬钩子属植物分为 8 个组,认为草本类群比木本类群进化,木莓组较空心莓组进化。而 ITS 序列与 cpDNA 联合应用,为空心莓组与木莓组的进化关系引入了新的证据(表 1)。Yang 等^[16]研究表明空心莓组的进化方式不是单向的,而是至少朝两个方向进化,呈现多系进化现象。空心莓组部分种类与木莓组有非常近缘的关系,且空心莓组较原始,木莓组可能由空心莓组的某个单系种进化而来^[15,49]。

此外,在树莓栽培品种间亲缘关系、杂种及多倍体的起源等问题上,ITS 序列也有较多应用。Korean cultivated bramble(KCB)在韩国广泛栽培,被认为是由韩国本地树莓插田泡驯化而来,但它们在叶和花的形态上却存在较大差异。为进一步探清该韩国树莓栽培资源的起源,Eu 等^[50]利用 ITS 序列对包含它在内的若干树莓类群展开了研究,结果表明,该树莓栽培资源(KCB)与黑树莓(*R. occidentalis*)亲缘关系更近,不支持插田泡是其祖先。*R. ursinus* 为太平洋黑莓,倍性变异丰富,呈现 6x、10x、11x、12x 等多种倍性。且 *R. ursinus* 在树莓育种上具有重要应用价值,以 6x *R. ursinus* 为育种材料,选育了‘Logan’、‘Boysen’等品种。但 *R. ursinus* 倍性来源和亲缘关系的模糊限制了其在育种上的广泛应用^[1,51-53]。Alice 等^[14,54]先后基于 ITS 序列研究表

明其与空心莓亚属的夏威夷特有种 *R. macraei* 为姐妹群关系;进一步的序列分析表明,*R. ursinus* 可能是 *R. macraei* 近缘种群与悬钩子亚属另一类群的杂交后裔。但这个结果只是基于 12x *R. ursinus* 的一个样本,并没有对不同个体及不同倍性水平的样本展开研究,因此其确切来源仍有待进一步研究。

ITS 序列在悬钩子属植物中虽应用广泛,有时对相关类群的研究却出现无法解释甚至相互矛盾的结果^[15]。究其原因,一方面,受 ITS 非协同进化的影响,它对于异源多倍体亲本的确定以及同倍性杂种的识别很有限度^[55-58];另一方面,ITS 假基因对系统关系重建的稳定性有着重要影响。ITS 假基因是 rDNA 串联重复未完成协同进化的结果,如果无意将 ITS 假基因加入到系统分析中可能对相关类群的系统发育分析造成困扰,甚至导致错误的推断。通过 PCR 优化阻止假基因的扩增,可以直接测序成功的样本,其 ITS 假基因的影响可以忽略。相反,对于存在个体内 ITS 多态性而不能直接测序的样本,就需要进行 ITS 假基因检测^[59-61]。在 Alice 和董晓莉等^[14-15,49,54,62]的研究中,虽然发现了 ITS 的个体内多态性,其中就可能包含了假基因拷贝,但几乎都未进行假基因的检测。因此,ITS 序列在悬钩子属植物的进化及系统学研究中还有待深入研究和重新评价。

1.3 低拷贝核基因在悬钩子属植物系统关系研究中的重要潜力

低拷贝核基因(low copy nuclear gene,LCNG)同时包含了多个进化速率较快的内含子和相对保守的外显子,能够揭示包含杂种和多倍体类群的网状进化规律,以及探明异源多倍体的起源^[55,63-66]。悬钩子属植物来源复杂,多杂种和多倍体。因此,对于该属植物的系统发育研究,低拷贝核基因的应用特别重要。

目前在悬钩子属中得到开发和应用的 LCNG 不多(表 1),只有 GBSSI(编码结合型淀粉合成酶)和 LEAFY(调控花分生组织和花期功能)有相关应用。兴安悬钩子 *R. chamaemorus* 为单性莓组 Sect. *Chamaemorus* 八倍体物种,探明其倍性来源及系统关系,能够为悬钩子属植物杂交、多倍化等进化历史提供分子证据。研究发现,GBSSI-1 在兴安悬钩子中有 2 个等位基因位点,通过分析不同位点的拷贝在系统树上的位置推测兴安悬钩子为异源多倍体,产生于多次杂交事件,*R. pedatus* 可能为其亲本^[44]。但同时也认为若要阐明其多次杂交事件及

物种形成机制,则需要结合其他序列(特别是低拷贝核基因),并对不同地理分布区域的兴安悬钩子展开研究。Yang 等^[17]首次利用 *LEAFY* 探讨韩国悬钩子属系统关系,认为 *LEAFY* 是对韩国悬钩子类群鉴定分类及系统发育研究比较理想的片段,并推论其系统演化规律是由草本到木本,由复叶到单叶,粉红色花瓣到白色花瓣。但这只是对韩国类群的研究,能否代表整个悬钩子属的演化规律还有待进一

表 1 DNA 序列在悬钩子属系统研究中的应用概况

Table 1 DNA sequences used for phylogenetic analysis in *Rubus*

DNA 片段 DNA fragment	分化度或 Pi 位点 Divergence or percentage of parsimony informative sites	主要结果 Main result	缺点 Main drawback
叶绿体基因组 cpDNA	<i>ndhF</i> ^[39]	<i>R. macraei</i> 未与 Subg. <i>Idaeobatus</i> 其他种聚为一支 <i>R. macraei</i> was distantly related to all species of Subg. <i>Idaeobatus</i>	<i>R. macraei</i> 的系统关系未得到解决 The ancestry of <i>R. macraei</i> was unknown.
	<i>ndhF</i> :18 ^Δ ^[40]	<i>R. macraei</i> 和 <i>R. hawaiiensis</i> 亲缘关系较远,它们形态相似为环境趋同进化的结果 <i>R. macraei</i> and <i>R. hawaiiensis</i> were not closely related. The similarities between the two were due to convergent evolution in the Hawaiian environment.	<i>R. macraei</i> 和 <i>R. ursinus</i> 的确切起源需进一步研究 The origin of <i>R. macraei</i> and <i>R. ursinus</i> had been questioned.
	<i>rbcL</i> ^[71]	10 个日本本地种和 15 个栽培品种被划分为 3 个类群 Ten native Japanese species and fifteen cultivars were separated into three groups.	—
核基因组 nDNA	ITS ^P , ITS1: 0.4 ~ 9.4; ITS2: 0 ~ 16 ^[14]	<i>R. ursinus</i> 为亚属间杂种; <i>Dalibarda repens</i> 镶嵌在悬钩子属各类群中 <i>R. ursinus</i> appeared to be a hybrid between Subg. <i>Idaeobatus</i> and Subg. <i>Rubus</i> . <i>Dalibarda repens</i> was nested within <i>Rubus</i> .	样本不够广泛,且近缘类群 ITS 序列变异较低 Only on a limited basis did they include all the <i>Rubus</i> taxa worldwide. ITS sequences showed low variability between closely related species.
	ITS ^P ^[62]	<i>R. caesius</i> 与 <i>R. idaeus</i> 之间存在基因流 Gene flow did occur naturally between <i>R. caesius</i> and <i>R. idaeus</i> .	—
	ITS ^P ^[54]	Subg. <i>Idaeobatus</i> 为多系起源, Subg. <i>Rubus</i> 为单系起源; <i>R. ursinus</i> 可能是 <i>R. macraei</i> 近缘种群与 Subg. <i>Rubus</i> 另一类群的杂交后裔 <i>Raspberries</i> (Subg. <i>Idaeobatus</i>) were clearly polyphyletic. <i>Blackberries</i> (Subg. <i>Rubus</i>) were monophyletic. <i>R. ursinus</i> might be of hybrid origin with a blackberry species serving as its maternal parent and the Hawaiian endemic <i>R. macraei</i> or a close relative as its paternal parent.	<i>Dalibarda repens</i> 的系统位置仍不清楚 The position of <i>Dalibarda repens</i> was unclear.
	ITS: 49.7 (Pi) ^[72]	黑莓和红树莓品种间具有遗传差异 Distinctions were revealed between blackberry and red raspberry cultivars.	黑莓部分品种 ITS 序列变异太低 DNA sequencing revealed little genetic variation among blackberry cultivars.
	ITS1: 2 (Pi); ITS2: 1.5 (Pi) ^[50]	插田泡 <i>R. coreanus</i> 不是韩国树莓栽培资源 (KCB) 的祖先 The result did not support the ancestry of KCB to <i>R. coreanus</i>	韩国树莓栽培资源的祖先仍不清楚 The ancestry of KCB was unknown.
联合分析 Combined analysis	ITS: 20.4 (Pi), <i>rpl16</i> + <i>trnK</i> + <i>trnL</i> -F: 5.3 (Pi), <i>GBSSI</i> -1: 8.5 (Pi) ^[43]	<i>R. ursinus</i> 和 <i>R. macraei</i> 都为杂种起源 <i>R. ursinus</i> and <i>R. macraei</i> were of hybrid origination.	ITS 和 cpDNA 系统树在某些地方存在冲突 With regard to the position of some species, ITS tree was not congruent with the cpDNA tree.
	ITS: 34.5 (Pi), <i>trnL</i> -F: 11 (Pi); ITS + <i>trnL</i> -F: 26 (Pi) ^[16]	支持 Naikai 的分类系统而不支持 Focke 的分类系统; 空心莓组至少朝两个方向进化 The results supported the sectional classification by Nakai, not by Focke. The Subg. <i>Idaeobatus</i> was a polyphyletic group that had gone through at two independent evolutionary process.	一致性指数 (CI) 较低, 部分节点支持率低; 部分种系统树位置冲突 It had shown a lower CI value and weak support value for several nodes.
	<i>rpl16</i> + <i>trnL</i> -F ^[73]	<i>Dalibarda repens</i> 与悬钩子属关系密切 <i>Dalibarda repens</i> was sister to a monophyletic <i>Rubus</i> .	—
	ITS, <i>trnS</i> - <i>trnG</i> : 6.2 (Pi), <i>GBSSI</i> -1: 12.3 (Pi) ^[44]	兴安悬钩子为异源多倍体 <i>Dalibarda repens</i> 与 <i>R. lasiococcus</i> 为姐妹关系 <i>R. chamaemorus</i> might be an ancient allopolyploid. <i>Dalibarda repens</i> was shown to be sister to <i>R. lasiococcus</i> .	ITS 序列分化度低 ITS showed a lower sequence divergence.
	ITS, <i>rpl16</i> , <i>trnK</i> , <i>trnL</i> -F, <i>GBSSI</i> -1 ^[74]	兴安悬钩子为异源多倍体 <i>R. chamaemorus</i> was an ancient allopolyploid.	未检测到 ITS 多态性 No nucleotide site polymorphism had been detected in ITS.
	ITS ^P , <i>trnL</i> -F, <i>rpl16</i> ^[49]	不丹悬钩子类群被划分为 5 大系; 木莓组可能由空心莓的某个单系种进化而来 <i>Rubus</i> in Bhutan comprised 34 species representing five lineages. Subgenus <i>Malachobatus</i> species were polyploid and originated from diploid ancestors, likely Asian Subg. <i>Idaeobatus</i> species.	研究样本仅为不丹分布种 Covering samples were only from Bhutan.
	ITS: 13 (Pi), <i>trnL</i> -F: 5 (Pi) ^[15]	空心莓组为多系进化; 椭圆悬钩子与红毛悬钩子关系较近, 而与其变种栽秧泡关系较远 <i>Raspberries</i> (Subg. <i>Idaeobatus</i>) were clearly polyphyletic. <i>R. ellipticus</i> were more closely related to <i>R. pinfaensis</i> than <i>R. ellipticus</i> var. <i>obcordatus</i> .	<i>trnL</i> -F 变异率和信息位点相对不足 <i>trnL</i> -F showed less variable and informative sites.
	<i>LEAFY</i> : 9.2 (Pi); <i>LEAFY</i> + ITS: 19.8 (Pi); <i>LEAFY</i> + <i>trnL</i> -F: 9.3 (Pi) ^[17]	韩国悬钩子类群系统演化进程是由草本到木本, 由复叶到单叶, 粉红色花瓣到白色花瓣 Evolution proceeded from herbs to woody plants, compound leaf to simple leaf, and pink petal to white petal within Korean <i>Rubus</i> taxa.	研究类群仅为韩国悬钩子分布种 (21 种); 部分类群表现为多叉分支 Covering samples were only 21 species from Korean taxa and some taxa formed polytomies.

注: ^P. 检测到个体内多态性的 ITS 序列; ^Δ. 序列分化平均值; 世界植物志悬钩子属分为 12 亚属, 中国植物志分为 8 组。

Note: ^P. Intra-individual polymorphism found among ITS sequence; ^Δ. Average of sequence divergence; *Rubus* species were divided into 12 subgenus and 8 sections according to Focke^[10-11] and Yü^[3], respectively.

步证实。相比 cpDNA, *GBSSI* 和 *LEAFY* 在悬钩子属植物上表现出较多的信息位点,特别是在较低分类阶元上能提供更多信息,且从系统树结构看其系统分析支持率比 ITS 和 cpDNA 均要高,因此它们对于悬钩子属系统关系的揭示具有重要潜力^[43]。

与 ITS 和 cpDNA 相比,低拷贝核基因对悬钩子属杂种、多倍体的系统关系重建具有特别重要的意义。但目前低拷贝核基因在该属的应用明显不足,应用的序列和研究类群较少,局限于地区分布种及个别杂种。因此,应进一步开发强有力的低拷贝核基因用于该属杂种、多倍体物种的系统重建和进化历史的阐释。如目前在被子植物中应用较多的 *Adh* (编码乙醇脱氢酶) 和 *RPB2* (编码 RNA 聚合酶 II 的第二大亚基) 等基因^[67-70]。 *Adh* 在芍药属 (*Paeonia*) 及蔷薇科梨属 (*Pyrus*) 系统学研究中显示出了巨大潜力^[67-68,70], 为该序列在悬钩子属中的应用提供了参考。

2 问题和展望

2.1 DNA 序列在悬钩子属系统学应用中的问题

如前所述,基于 DNA 序列信息为悬钩子属植物系统发育和分类提供了参考依据,同时处理了一些有争议的分类群。但由于取样范围的局限及对 DNA 片段的认识及应用的不足,目前基于 DNA 序列对种类繁多、类群复杂的悬钩子属特别是中国悬钩子属植物的系统发育研究还很有限(表 1)。主要表现在以下几方面:

(1) 研究类群较少。学者们的研究大多仅限于地方栽培品种、本地地方种质或欧美、韩国等地区分布种,对于野生资源丰富的亚洲地区的种质未涉及或取样较少,而中国悬钩子属特有种几乎未有涉及。悬钩子属植物进化历史复杂,进化过程中经历了广泛的杂交^[62]、多倍化^[1] 和基因渐渗^[75] 等。因此,对于该属植物的系统研究,研究类群的选择至关重要。

(2) DNA 序列应用较少,且在该属植物的应用中存在不足。DNA 序列的应用主要以 ITS 为主,部分叶绿体基因片段也有联合分析,而低拷贝核基因则相对较少。且研究手段以单一序列为主,提供的系统信息有限,虽有多序列联合分析趋势,但研究不够深入,未见同时利用不同进化速率的不同区域的核 DNA 和叶绿体 DNA 对该属植物不同分类阶元的系统研究报道。其次,ITS 序列除存在个体内多态性需检测假基因外,其在悬钩子属部分栽培品种间、近缘种间的变异率较低。且叶绿体非编码区

在该属植物中部分序列呈现较低水平的序列变异,或构建的系统树支持率低,不能理想地解决系统关系^[14-15,72]。

2.2 展望

如前所述,DNA 序列在悬钩子属植物分子系统学研究中应用广泛,为该属植物的系统发育与分类提供了证据,但仍存在问题和不足。因此,目前悬钩子属植物仍然缺乏一个坚实的分子系统框架。中国作为现代悬钩子属植物的重要分布中心之一,明晰中国悬钩子属的系统发育关系至关重要。基于上述问题,我们认为应从以下几个方面努力:

(1) 选取具有代表性的样本,包括取样范围和取样密度。首先,在侧重研究空心莓组与木莓组的系统关系基础上,应立足于整个中国悬钩子属,全面展开对该属不同组、亚组、种间以及种内不同居群间等不同分类阶元的系统关系研究,特别应注意不同地理来源的种以及居群的研究。悬钩子属部分种、变种及种内居群的界限模糊,呈现连续变异。对种下居群间的研究,可以明晰种的界限、探清该属种内进化方式。其次,对中国悬钩子属的系统发育研究,中国西南地区应是着重考虑的区域。中国悬钩子属特有种达 138 种以上,而其绝大部分集中分布在中国西南地区(云南、四川、贵州),该区域不仅是现代悬钩子属植物的重要分布中心之一,同时也是分化中心,涉及到属的种类发生,是起源中心的关键地区^[2]。在我们以往研究中,只涉及到该区域部分种类^[15]。因此,对于悬钩子属植物的系统研究,应着重考虑西南地区的采样密度。

(2) 联合利用不同基因组来源、不同进化速率的 DNA 片段,尤其是单或低拷贝核基因。一方面,筛选适合该属植物系统学研究的叶绿体 DNA 序列,同时应用多种 cpDNA 序列联合分析。进一步开发强有力的单或低拷贝核基因序列,特别是利用 LC-NG 内含子对悬钩子属多倍体和杂种进行系统重建,阐明其多倍化和物种形成机制。且应针对不同分类阶元的系统研究,筛选合适的 DNA 片段。此外,在核基因的应用中,应注意种源、基源拷贝、重组子的辨别及 ITS 假基因的检测^[56,76-77]。

(3) 在利用 DNA 序列信息分析的同时,应结合形态学、孢粉学、细胞学以及分子生物学等相关研究结果。在 Alice^[14] 的研究中,结合悬钩子属植物叶型特征、植株茎秆柔毛和刺毛的有无及物种倍性对该属植物的系统关系进行了联合分析。此外,悬钩子属植物花序及果实特征作为形态分类的重要依

据,也可用于联合分析^[3,10-11]。同时,基于多基因的系统发育研究构建的基因树(gene tree),虽能在一定程度上反映物种的进化史,却不能等同于物种树(species tree)^[78-79]。开展该属植物的基因组测序工作,结合基因组数据的系统发育基因组学研究也是未来悬钩子属植物系统发育研究的一个重要方向。综上,结合多种手段的分析结果才能够更真实地反

映该属植物的系统发育关系。

总之,对于中国悬钩子属植物系统学研究,需充分评价 DNA 片段的系统学价值及结合该属植物的遗传背景,同时开展多序列、多类群、多阶元及多地理分布区域的悬钩子属系统学研究,方能对该属植物的系统进化问题进行科学推测和阐释。

参考文献:

- [1] THOMPSON M M. Survey of chromosome numbers in *Rubus* (Rosaceae; Rosoideae)[J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1997, **84**(1): 128—164.
- [2] LU L D(陆玲娣). A study on the genus *Rubus* of China[J]. *Journal of Systematics and Evolution*(植物分类学报), 1983, **21**(1): 13—25 (in Chinese).
- [3] 俞德浚, 陆玲娣, 谷粹芝, 等. 中国植物志(第 37 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 10—218.
- [4] 桂明珠, 胡宝忠. 小浆果栽培生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 48—72.
- [5] GU Y(顾 姻), WANG CH Y(王传永), ZHAO CH M(赵昌民), et al. Evaluation of *Rubus* genetic resources[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境), 1996, **5**(3): 6—13 (in Chinese).
- [6] WANG X R(王小蓉), TANG H R(汤浩茹), DENG Q X(邓群仙). Advancement in research of genetic diversity of bramble (*Rubus* L.) and its breeding in China[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2006, **33**(1): 181—187 (in Chinese).
- [7] ZHONG B F(钟必凤), WANG X R(王小蓉), DENG J L(邓家林), et al. Observation and evaluation on seven wild bramble excellent germplasms distributed in Sichuan Province[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*(西南农业学报), 2011, **24**(6): 2 332—2 335 (in Chinese).
- [8] EVANS K J, SYMON D E, WHALEN M A, et al. Systematics of the *Rubus fruticosus* aggregate(Rosaceae) and other exotic *Rubus* taxa in Australia[J]. *Australian Systematic Botany*, 2007, **20**(3): 187—251.
- [9] DICKINSON T A, LO E, TALENT N. Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classification[J]. *Plant Systematic and Evolution*, 2007, 266: 59—78.
- [10] FOCKE W O. Species Ruborum, part I[M]. Bibliotheca Botanica; Abhandlungen aus dem Gesamtgebiete der Botanik, 1910, **17**(72): 1—120.
- [11] FOCKE W O. Species Ruborum, part III[M]. Bibliotheca Botanica; Abhandlungen aus dem Gesamtgebiete der Botanik, 1914, **17**(83): 224—498.
- [12] LU L D(陆玲娣). Notes on species of some genera of Rosaceae, China[J]. *Journal of Systematics and Evolution*(植物分类学报), 2000, **38**(3): 276—281 (in Chinese).
- [13] HUANG J Y, HU J M. Revision of *Rubus*(Rosaceae) in Taiwan[J]. *Taiwania*, 2009, **54**(4): 285—310.
- [14] ALICE L A, CAMPBELL C S. Phylogeny of *Rubus*(Rosaceae) based on nuclear Ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences[J]. *American Journal of Botany*, 1999, **86**(1): 81—97.
- [15] 董晓莉. 西南地区悬钩子属分子系统学研究及其与栽培品种的遗传差异分析[D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2009.
- [16] YANG J Y, PAK J H. Phylogeny of Korean *Rubus*(Rosaceae) based on ITS(nrDNA) and *trnL-F* intergenic region(cpDNA)[J]. *Journal of Plant Biology*, 2006, **49**(1): 44—54.
- [17] YANG J Y, YOON H S, PAK J H. Phylogeny of Korean *Rubus*(Rosaceae) based on the second intron of the *LEAFY* gene[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2012, **92**(3): 461—472.
- [18] LI W L(李维林), HE SH A(贺善安). Taxonomic revision on several taxa in the genus *Rubus*(Rosaceae)[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究), 2001, **21**: 346—249 (in Chinese).
- [19] WANG X R, TANG H R, ZHANG H W, et al. Karyotypic, palynological, and RAPD study on 12 taxa from two subsections of section *Idaeobatus* in *Rubus* L. and taxonomic treatment of *R. ellipticus*, *R. pinfaensis*, and *R. ellipticus* var. *obcordatus*[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2009, **283**(1): 9—18.
- [20] WANG X R(王小蓉), TANG H R(汤浩茹), HUANG L(黄 力), et al. Comparative studies on pollen submicroscopic morphology of some wild species and cultivars of bramble(*Rubus* L.)[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2007, **34**(6): 1 395—1 404 (in Chinese).
- [21] WANG X R(王小蓉), TANG H R(汤浩茹), DUAN J(段 娟), et al. A comparative study on karyotypes of 28 taxa in *Rubus* sect. *Idaeobatus* and sect. *Malachobatus*(Rosaceae) from China[J]. *Journal of Systematics and Evolution*(植物分类学报), 2008, **46**(4): 505—515 (in Chinese).
- [22] IWATSUBO Y, NARUHASHI N. Karyomorphological and cytogenetical studies of *Rubus parvifolius*, *R. coreanus* and *R. × hiraseanus* (Rosaceae)[J]. *Cytologia*, 1991, **56**(1): 151—156.
- [23] IWATSUBO Y, NARUHASHI N. Cytogenetic studies of natural hybrid, *Rubus × hiraseanus*, and artificial hybrid between *R. coreanus* and *R. parvifolius*(Rosaceae)[J]. *Cytologia*, 1998, **63**(2): 235—238.
- [24] MAKINO T. Observations on the flora of Japan[M]. Tokyo: The Botanical Magazine, 1902: 125—152.
- [25] WANG Y, CHEN Q, HE W, et al. Genetic relationships between *Rubus parvifolius* and *R. coreanus*(Rosaceae), and preliminary identi-

- cation one of their putative hybrids[J]. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2013, **73**(1): 72—81.
- [26] ZHANG H W, WANG X R, ZHONG B F, *et al.* Genetic relationships among 17 bramble cultivars and 11 wild excellent *Rubus* germplasms from China revealed by RAPD[J]. *Agricultural Journal*, 2009, **4**(4): 179—183.
- [27] WANG X R(王小蓉), TANG H R(汤浩茹), FU H Q(付华清), *et al.* Chromosome numbers and karyotypes of 10 wild bramble(*Rubus* L.) species from Southwest of China[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2008, **35**(3): 343—350(in Chinese).
- [28] WANG X R(王小蓉), TANG H R(汤浩茹), FU H Q(付华清), *et al.* Karyotypes of 15 introduced bramble cultivars(*Rubus*)[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2008, **44**(12): 147—150(in Chinese).
- [29] WANG X R, LIU Y, ZHONG B F, *et al.* Cytological and RAPD data revealed genetic relationships among nine selected populations of the wild bramble species, *Rubus parvifolius* and *R. coreanus*(Rosaceae)[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2010, **57**(3): 431—441.
- [30] DONG X L, TANG H R, LING L, *et al.* Genetic diversity of 18 bramble cultivars introduced abroad and 8 wild materials of *Rubus coreanus* from China revealed by RAPD[J]. *Journal of Molecular Genetics*, 2009, **1**(1): 1—6.
- [31] MEISTER J, HUBAISHAN M A, KILIAN N, *et al.* Temporal and spatial diversification of the shrub *Justicia areysiana* Deflers(Acanthaceae) endemic to the monsoon affected coastal mountains of the southern Arabian Peninsula[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2006, **262**: 153—171.
- [32] ZIMMER E A, WEN J. Reprint of: Using nuclear gene data for plant phylogenetics: Progress and prospects[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, **66**(2): 539—550.
- [33] SMALL R L, RYBURN J A, CRONN R C, *et al.* The tortoise and the hare: Choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group[J]. *American Journal of Botany*, 1988, **85**(9): 1 301—1 315.
- [34] XU D H, ABE J, KANAZAWA A, *et al.* Identification of sequence variations by PCR-RFLP and its application to the evaluation of cpDNA diversity in wild and cultivated soybeans[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **102**: 683—688.
- [35] PETIT R J, DUMINIL J, FINESCHI S, *et al.* Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations[J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(3): 689—701.
- [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]. *American Journal of Botany*, 2005, **92**(1): 142—166.
- [37] SHAW J, LICKEY E B, SCHILLING E E, *et al.* Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III[J]. *American Journal of Botany*, 2007, **94**(3): 275—288.
- [38] WAGNER W L, HERBST D R, SOHMER S H. Manual of the flowering plants of Hawai'i[M]. Honolulu: University of Hawai'i Press and Bishop Museum Press, 1990.
- [39] HOWARTH D G, GARDNER D E, MORDEN C W. Phylogeny of *Rubus* subgenus *Idaeobatus*(Rosaceae) and its implications toward colonization of the Hawaiian islands[J]. *Systematic Botany*, 1997, **22**(3): 433—441.
- [40] MORDEN C W, GARDNER D E, WENIGER D A. Phylogeny and biogeography of pacific *Rubus* subgenus *Idaeobatus*(Rosaceae) species; investigating the origin of the endemic Hawaiian raspberry *R. macraei*[J]. *Pacific Science*, 2003, **57**(2): 181—197.
- [41] ROVA J H E, DELPRETE P G, ANDERSSON L, *et al.* A *trnL-F* cpDNA sequence study of the condamineae-rondeletieae-sipaneeae complex with implications on the phylogeny the Rubiaceae[J]. *American Journal of Botany*, 2002, **89**(1): 145—159.
- [42] JOHNSON L A, CHAN L M, WEESE T L, *et al.* Nuclear and cpDNA sequences combined provide strong inference of higher phylogenetic relationships in the phlox family(Polemoniaceae)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, **48**(3): 997—1 012.
- [43] SUTHERLAND B. Phylogenetics of *Rubus ursinus* and *R. macraei*(Rosaceae): Evidence of hybrid origin[D]. Bowling Green: Western Kentucky University, 2005.
- [44] MICHAEL K. Clarification of basal relationships in *Rubus*(Rosaceae) and the origin of *Rubus chamaemorus*[D]. Bowling Green: Western Kentucky University, 2006.
- [45] SCHWARZBACH A E, RICKLEFS R E. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology[J]. *American Journal of Botany*, 2000, **87**(4): 547—564.
- [46] STANFORD A M, HARDEN R, PARKS C R. Phylogeny and biogeography of *Juglans*(Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data[J]. *American Journal of Botany*, 2000, **87**(6): 872—882.
- [47] KAN X Z, WANG S S, DING X, *et al.* Structural evolution of nrDNA ITS in Pinaceae and its phylogenetic implications[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, **44**(2): 765—777.
- [48] VOLKOV R A, KOZERETSKA I A, KYRYACHENKO S S, *et al.* Molecular evolution and variability of ITS1-ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the maritime Antarctic[J]. *Polar Science*, 2010, **4**(3): 469—478.
- [49] ALICE L A, DODSON T M, SUTHERLAND B L. Diversity and relationships of bhutanese *Rubus*[J]. *Acta Horticulture*, 2008, **777**: 63—70.
- [50] EU G S, PARK M R, YUN S J. Internal transcribed spacer(ITS) regions reveals phylogenic relationships of *Rubus* species cultivated in Korea[J]. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 2009, **17**(3): 165—172.
- [51] THOMPSON M M. Cytogenetics of *Rubus* III. Cytological studies of the varieties 'Young', 'Boysen' and related forms[J]. *American Journal of Botany*, 1961, **48**(8): 667—673.
- [52] BROWN S W. The origin and nature of variability in the pacific coast blackberries(*Rubus ursinus* Cham. & Schlecht. and *R. lemum* Sp. Nov.)[J]. *American Journal of Botany*, 1943, **30**(9): 686—697.
- [53] MENG R. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2002, **127**(5): 767—775.

- [54] ALICE L A. Evolutionary relationships in *Rubus*(Rosaceae) based on molecular data[J]. *Acta Horticulture*, 2002, 585: 79—83.
- [55] ALVAREZ I, WENDEL J F. Ribosomal ITS sequence and plant phylogenetic inference[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(3): 417—434.
- [56] ZHENG X Y, CAI D Y, YAO L H, *et al.* Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus* [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 48: 892—903.
- [57] CALONJE M, MARTIN-BRAVO S, DOBES C, *et al.* Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2009, 282: 257—280.
- [58] POCZAI P, HYVÖNEN J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(4): 1 897—1 912.
- [59] HARPKE D, PETERSON A. Non-concerted ITS evolution in *Mammillara*(Cactaceae)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 41(3): 579—593.
- [60] FELINER G N, ROSSELLÓ J A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(2): 911—919.
- [61] OCHIENG J W, HENRY R J, BAVERSTOCK P R, *et al.* Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(2): 752—764.
- [62] ALICE L A, ERIKSSON T, ERIKSEN B, *et al.* Hybridization and gene flow between distantly related species of *Rubus*(Rosaceae): Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences[J]. *Systematic Botany*, 2001, 26(4): 769—778.
- [63] SANG T. Utility of low-copy nuclear gene sequence in plant phylogenetics[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 37(3): 121—147.
- [64] YING LO E Y. Global and fine scale molecular studies of polyploidy evolution in *Crataegus* L. (Rosaceae)[D]. Toronto: University of Toronto, 2008.
- [65] VILATERSANA R, BRYSTING A K, BROCHMANN C. Molecular evidence for hybrid origins of the invasive polyploids *Carthamus creticus* and *C. tuckermansii*(Cardueae, Asteraceae)[J]. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 2007, 44(2): 610—621.
- [66] LIU ZH P(刘志鹏), WANG N F(王能飞), ZHAO A Y(赵爱云), *et al.* The evolution and expression of low-copy nuclear genes in allopolyploid plants[J]. *Hereditas(遗传)*, 2007, 29(2): 163—171(in Chinese).
- [67] SANG T, CRAWFORD D J, STUESSY T F. Documentation of reticulate evolution in peonies(*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA; implications for biogeography and concerted evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(15): 6 813—6 817.
- [68] SANG T, DONOGHUE M J, ZHANG D. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in peonies(*Paeonia*): phylogenetic relationships of putative nonhybrid species[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1997, 14(10): 994—1 007.
- [69] FERGUSON D, SANG T. Speciation through homoploid hybridization between allotetraploids in peonies(*Paeonia*)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(7): 3 915—3 919.
- [70] ZHENG X Y, HU C Y, SPOONER D, *et al.* Molecular evolution of *Adh* and *LEAFY* and the phylogenetic utility of their introns in *Pyrus* (Rosaceae)[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, 11: 255.
- [71] IMANISHI H, NAKAHARA K, TSUYUZAKI H. Genetic relationships among native and introduced *Rubus* species in Japan based on *rbcL* sequence[J]. *Acta Horticulture*, 2008, 769: 195—199.
- [72] STAFNE E T, CLARK J R, SZALANSKI A L. Nuclear ribosomal ITS region sequences for differentiation of *Rubus* genotypes[J]. *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 2003, 57: 176—180.
- [73] ALICE L, DODSON T M. Inferring the phylogeny of *Rubus*(Rosaceae) using chloroplast DNA sequences[C]//Botany Conference, 2006: 30—31.
- [74] AMBROSE-MICHAEL K, ALICE L. Nuclear *GBSSI* sequences demonstrate a hybrid origin of 8x *Rubus chamaemorus*(Rosaceae)[C]//Botany Conference, 2006: 48—180.
- [75] LIM K Y, LEITCH I J, LEITCH A R. Genomic characterisation and the detection of raspberry chromatin in polyploid *Rubus*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(7): 1 027—1 033.
- [76] SONNHAMMER E L L, KOONIN E V. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes[J]. *Trends in Genetics*, 2002, 18(12): 619—620.
- [77] ZHANG D, HEWITT G M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects[J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12: 563—584.
- [78] ZOU X H(邹新慧), GE S(葛 颀). Conflicting gene trees and phylogenomics[J]. *Journal of Systematics and Evolution(植物分类学报)*, 2008, 46: 795—807(in Chinese).
- [79] NEVES S S, FORREST L L. Plant DNA sequencing for phylogenetic analyses: from plants to sequences[M]. Network Biology: Methods and Applications. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2011, 781: 183—235.