

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

ITS 序列及其 SNP 位点在外来入侵杂草长芒苋、西部苋和糙果苋物种鉴定中的应用

徐 晗^{1,2*}, 赵彩云¹, 刘勇波¹, 陈鹏程³, 李俊生^{1*}(1. 中国环境科学研究院, 北京 100012; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176;
3. 绍兴出入境检验检疫局, 绍兴 312000)

摘要 对于以种子形态为物种主要识别依据的口岸部门, 外来入侵杂草长芒苋、西部苋和糙果苋一直是鉴定的难点。本文对 34 种苋属植物的 ITS 序列和 26S rDNA 进行分析, 通过 SNP 变异位点及特异性引物, 借助 PCR-RFLP 方法, 对长芒苋、西部苋与糙果苋进行快速、准确的分类鉴定。ITS 序列分析表明, 长芒苋种内变异小, 种间变异显著, 可与其他苋属植物明显区分。西部苋与糙果苋之间 ITS 序列差异小, 需依据 SNP 位点来区别。

关键词 ITS 序列; 异株苋亚属; 长芒苋; 西部苋; 糙果苋; 26S rDNA; SNP; PCR-RFLP

中图分类号: S 451; S41 - 30 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.05.021

Taxonomic circumscription of *Amaranthus palmeri*, *A. rudis* and *A. tuberculatus* (Amaranthaceae) based on ITS sequences and SNP analysisXu Han^{1,2}, Zhao Caiyun¹, Liu Yongbo¹, Chen Pengcheng³, Li Junsheng¹(1. Chinese Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;
3. Shaoxing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhejiang 312000, China)

Abstract Alien invasive weeds *Amaranthus palmeri*, *A. rudis* and *A. tuberculatus* are difficult to distinguish from each other, and taxonomical identification only depends on seed morphologies. In this study, *A. palmeri*, *A. rudis* and *A. tuberculatus* could be identified quickly and precisely through PCR-RFLP method, based on ITS and 26S rDNA analyses, and specific primers designed by SNP. The results show that there is no intraspecific variation within *A. palmeri* populations, but interspecific variation is significant. *A. palmeri* can be differentiated from other congeneric species by ITS. However, differences of ITS sequences between *A. rudis* and *A. tuberculatus* are small, they should be defined further by SNP analysis.

Key words ITS; subgen. *Acnida*; *Amaranthus palmeri*; *Amaranthus rudis*; *Amaranthus tuberculatus*; 26S rDNA; SNP; PCR-RFLP

外来入侵植物长芒苋 *Amaranthus palmeri* Watson、西部苋 *A. rudis* Sauer 和糙果苋 *A. tuberculatus* (Moq.) Sauer 隶属苋科 Amaranthaceae 苋属 *Amaranthus* 异株苋亚属 *Acnida*, 原产北美, 是美国大豆、玉米田的超级杂草^[1-2]。近几年随中美两国贸易增加, 经粮食等货物传入我国风险加大, 已在我国口岸多次被截获^[3]。长芒苋、西部苋和糙果苋雌

雄异株, 与中国苋属雌雄同株种类相比, 容易区分。其中, 长芒苋雌株具有圆锥形穗状长花序和芒尖状硬直苞片等明显特征, 容易识别。但西部苋和糙果苋形态相近, 种间常发生杂交, 一直是分类上的难题。Sauer^[4-5]根据雌花花被片数目及等位酶分析将西部苋和糙果苋分开。Robertson^[6]和 Pratt^[7]认为西部苋和糙果苋地理分布重叠, 不能分为严格意义

收稿日期: 2016-12-13

修订日期: 2017-01-30

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1201105); 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2014JK010, 2017JK038)

致谢: 向为本研究提供试验材料和热心帮助的舟山出入境检验检疫局李筱筱老师、泉州出入境检验检疫局曾思海老师、广东出入境检验检疫局技术中心吴海荣老师致以衷心的感谢!

* 通信作者 E-mail: lijsh@caes.org.cn; xuhanin@gmail.com

上的两个种。Costea 和 Tardif^[8]建议将二者并为一个种,将西部苋作为糙果苋的变种 *A. tuberculatus* (Moq.) Sauer var. *rudis* (Sauer) Costea & Tardif。笔者对西部苋和糙果苋长期观察研究发现,形态学上,西部苋与糙果苋雌株可通过胞果以及叶片的特征来区分,但雄株却难以分清。此外,苋属种子小,仅 1 mm 左右,形态学分辨技术难以掌握,容易误判^[9]。因此,借助新的方法来澄清两个物种的分类问题十分必要。

内转录间隔区 ITS(internal transcribed spacer)位于 rRNA 编码基因 18S、5. 8S 和 26S 之间。通常作条形码使用的 ITS 序列指 ITS1、5. 8S 和 ITS2。这些 rDNA 高度保守地分布在染色体的不同位置,在每个单倍染色体基因组中的拷贝数超过 200 个。根据保守序列中的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点设计引物进行特异性扩增比较,可用于物种鉴定。多拷贝序列 26S rDNA 是编码核糖体亚基的基因,序列长度在 600 bp 左右。Gutell 等研究表明这段区域具有较高的变异率,可以用于亲缘关系较近的物种间的分类研究^[10]。将 ITS 序列与 26S rDNA 相结合,可发现更有价值的分子标记,进而用于种下单元鉴定。

单核苷酸多态性是指由于单个核苷酸的变异所形成的遗传标记,其数量多、多态性丰富、适于快速、自动化分析。SNP 的检测方法有多种,但是由于技术难度高、成本费用高,其应用受到了阻碍。PCR-RFLP 分子标记技术又称酶切扩增多态性序列(cleaved am-

plified polymorphic sequences, CAPS) 标记技术,是一类以 PCR 为基础的共显性的分子标记。自 1993 年 Konieczny 和 Ausubel 在拟南芥上发展 CAPS 标记以来^[11],因其具有共显性、位点特异性、操作简单、成本低、所需 DNA 样品量少和对 DNA 的纯度要求不高等优点成为现代生物学研究的一个非常重要的分子标记技术。在种质鉴定、辅助育种、基因鉴定和图谱构建等领域得到相当广泛的应用^[12-13]。

宋葆华等^[14-15]曾采用 RAPD 方法和 ITS 序列对中国苋属植物系统进化关系进行研究,证明除凹头苋亚属 *Albersia* 以及苋亚属 *Amaranthus* 的绿穗苋 *A. hybridus* 复合群分类效果不理想之外,运用 ITS 序列进行苋属植物的分类效果较好。本文在扩充物种和样本数量的基础上,采用 ITS 序列及其 SNP 位点对长芒苋、西部苋和糙果苋三种外来入侵植物进行分类研究。本研究在苋属植物种子分类鉴定以及西部苋和糙果苋的分类问题上具有十分重要的意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 2005 年至今本实验室收集的苋属 16 种(表 1)21 个居群的 51 份样品,以及 2 种作为外类群的青葙 *Celosia argentea* 和空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* 的植株和种子标本。标本采自国内或来自口岸截获的粮谷下脚料中。所有材料均通过专家复核鉴定。

表 1 植物材料及来源
Table 1 Plant materials and location

中文名 Chinese name	学名 Scientific name	标本来源 Location	标本采集信息(号) Collection information
白苋	<i>Amaranthus albus</i>	中国内蒙古	H. Xu (2012)
北美苋	<i>A. blitoides</i>	中国内蒙古	H. Xu (2012)
凹头苋	<i>A. blitum</i>	中国北京	H. Xu (2012)
繁穗苋	<i>A. cruentus</i>	英国	UK SEED
胀果苋	<i>A. deflexus</i>	西班牙巴塞罗那	H. Xu (2012)
绿穗苋	<i>A. hybridus</i>	中国北京	H. Xu (1113)
长芒苋	<i>A. palmeri</i>	中国北京	H. Xu et al. (2012)
		美国西雅图	1-8-14928
		阿根廷	1-8-14514
		中国福建	H. Xu et al. (2010)
反枝苋	<i>A. retroflexus</i>	中国内蒙古	H. Xu (2012)
刺苋	<i>A. spinosus</i>	中国福建	H. Xu et al. (2010)
菱叶苋	<i>A. standleyanus</i>	中国北京	Z. Y. Li (11350)
薄叶苋	<i>A. tenuifolius</i>	中国山东	Y. T. Hou (2008)
皱叶苋	<i>A. crispus</i>	中国河北	H. Xu et al. (2010)
苋	<i>A. tricolor</i>	中国北京	H. Xu (2012)
糙果苋	<i>A. tuberculatus</i>	中国福建	H. Xu et al. (2010)

续表 1 Table 1(Continued)

中文名 Chinese name	学名 Scientific name	标本来源 Location	标本采集信息(号) Collection information
西部苋	<i>A. rudis</i>	中国福建	H. Xu et al. (2010)
		中国江苏	H. Xu et al. (2011)
		中国广东	H. R. Wu (2012)
		中国北京	Z. X. Li (2012)
皱果苋	<i>A. viridis</i>	中国北京	H. Xu (2008)
青葙	<i>Celosia argentea</i>	中国北京	H. Xu (2011)
空心莲子草	<i>Alternanthera philoxeroides</i>	中国重庆	Z. Y. Li (2010)

1.2 DNA 提取

称取经硅胶干燥的植物叶片或种子 100 mg 置于事先加入 4 mm 钢珠的 2 mL EP 管中,迅速放入液氮中冷冻,将 EP 管置于 Geno/Grinder 2000 (SPEX SamplePrep)高通量研磨机上,1 000 r/min 研磨 1.5 min。用 Tiangen 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取叶片总 DNA。

1.3 基因扩增及测序

ITS 序列通用引物为 ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTA-TTGATATGC-3')。PCR 反应体系:25 mmol/L MgCl₂ 2 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,10×PCR 缓冲液 2.5 μL,2.5 μmol/L 引物各 1.0 μL,聚合酶 1 U,总 DNA 1 μL(约 30 ng),灭菌水补足 25 μL。扩增程序:94℃变性 5 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 90 s(进行 30 个循环);72℃延伸 10 min。

ITS616 序列通用引物为 347f(5'-CCC GTGA-ACCATCGAGTT-3')和 807r (5'-AACATCAGA-CCTCTTCGCAGG-3)(专利申请号:2016111851567)。PCR 反应体系 25 μL:30 ng/μL 模板 DNA 1 μL,10 μmol/L引物各 1 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.3 μL,10×PCR 反应缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2 μL,余量为水。PCR 扩增程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,51℃ 60 s,72℃ 35 s,35 个循环;72℃ 10 min。3%琼脂糖凝胶电泳检查结果。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后,由上海生物工程技术服务有限公司测序,扩增引物同时作为测序引物进行双向测序。

1.4 序列分析及系统树构建

序列编辑和拼接应用 Lasergenev 7.1 软件中的 SeqMan 完成,用 Clustal X 进行序列比对。以青葙和空心莲子草为外类群,使用 MEGA 6.0 软件进行系统发育分析。空位被处理为缺失,以邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统分支树。NJ 树序列间分化程度

使用 Kimura 双参数遗传距离(Kimura 2-parameter distance,K2-P)度量,每一分支的自展支持率为 1 000 次重复取样的计算结果。

用于糙果苋和西部苋 SNP 位点分析的序列除来自本试验样本外,还含有 GenBank 中苋属植物 ITS 序列,共计 34 种 177 条。对序列进行比对分析后,根据糙果苋全基因组序列的 contig00002 片段(GenBank 编号:ACQK00000000.1ACQK01000002.1),在 SNP 位点下游扩展寻找合适区间,通过 Primer Premier 5 软件设计特异引物,扩增易于检测该位点的序列。并将扩增的目的片段命名为 ITS616(专利申请号:2016111851567)。

1.5 PCR-RFLP 酶切反应

PCR-RFLP 酶切反应体系为 20 μL:1 μg/μL 模板 DNA 10 μL,10×buffer 2.0 μL,Sty I(Eco130 I)酶 1 μL,余量为水。PCR-RFLP 酶切反应条件为:37℃水浴 1 h。3%琼脂糖凝胶电泳检查结果。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列系统发育关系

以 NJ 法构建的 ITS 序列系统树将苋属植物分为 5 个进化支(图 1)。其中,长芒苋与同亚属的西部苋和糙果苋分开,与刺苋聚在一起组成 clade 3。且长芒苋种内变异小,种间变异显著,可与其他苋明显区分。西部苋和糙果苋以 97%的自展支持率聚为 clade 1,两者虽然可以与其他苋区分,但西部苋和糙果苋之间差异小,同源性高,需借助特异性位点进一步界定。

2.2 西部苋和糙果苋的区分

在对 34 种苋属植物的 177 条 ITS 基因序列进行比较后,发现糙果苋与西部苋以及其他苋在 616 位点存在稳定的变异,糙果苋在该位点为杂合位点 A(A>G),西部苋及其他苋在该位点为纯合位点 G(图 2)。该 SNP 位点与相邻碱基组成“CCAAGG”,

为 *Sty* I 内切酶识别位点。酶切后,糙果苋呈现 3 条带,依次为 461、273、188 bp,其他无变异位点物种

仅有 461 bp 一个条带(图 3)。根据该特异性位点,可将西部苋和糙果苋相区分。

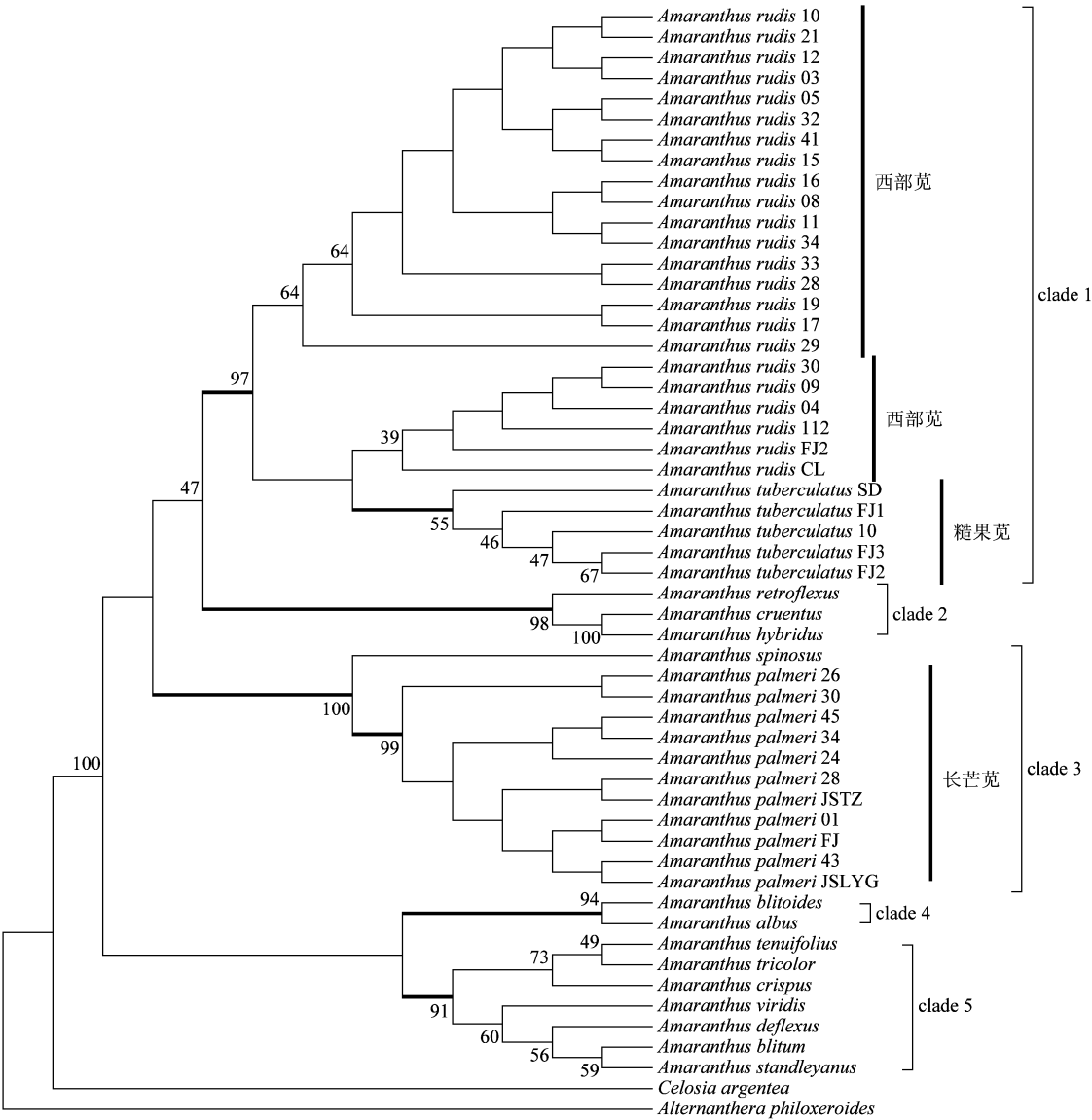


图 1 根据 NJ 法构建的苋属植物 ITS 序列系统进化树图
Fig. 1 Phylogenetic tree of *Amaranthus* constructed by NJ method

3 讨论

ITS 序列已广泛应用于解决科内不同等级的系统发育和分类问题^[16],并被 Kress 等人选作植物条形码候选序列^[17]。宋葆华等已对中国苋属 16 个类群 ITS 序列进行系统进化关系分析,表明 ITS 序列在苋属属内具有良好的分类价值^[15]。但之前研究的种类不全,存在大量异名问题。本研究发现,苋属大部分植物,包括长芒苋,可以通

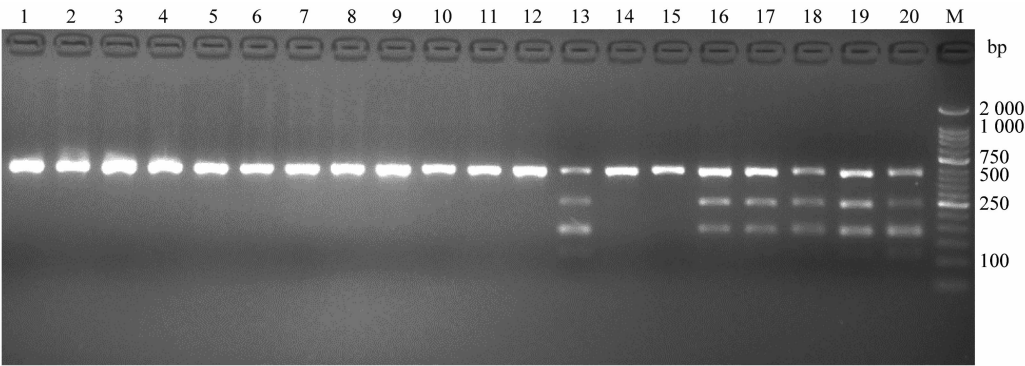
过 ITS 序列相区分。但西部苋和糙果苋 ITS 序列的种间差异却很小,需借助 SNP 位点进一步辨识。SNP 标记于 1994 年被首次提出,在拟南芥、水稻、马铃薯等植物的研究中已得到了很好的应用^[18-20]。随着 DNA 条形码技术从基因跨越到基因组时代,SNP 在物种鉴定、系统进化等领域发挥了越来越多的作用^[21]。这种基因上的单核苷酸多态性可辅助形态特征,对糙果苋和西部苋进行最终判定。

<i>A. tuberculatus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	A	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. rudis</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. palmeri</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. acanthochiton</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. acutilobus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. arenicola</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. australis</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. blitum</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. blitoides</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. californicus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. capensis</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. crassipes</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. crispus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. deflexus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. dubius</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. fimbriatus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. floridanus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. graecizans</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. greggii</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. hybridus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. hypochondriacus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. muricatus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. paniculatus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. polygonoides</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. powellii</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. quitensis</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. retroflexus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. spinosus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. standleyanus</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. tamaulipensis</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	A	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. tenuifolius</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. tricolor</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. viridis</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	T	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C
<i>A. wrightii</i>	G	T	G	G	C	C	T	T	G	A	G	G	A	C	C	C	T	A	G	A	G	C	G	T	T	G	C	C	C	C	G	A	G	G	G	C	G	A	C	C	A	A	C	C

横长条框内为酶切位点,竖长条框内为碱基变异位置
The bases encircled by the horizontal rectangular frame represent restriction enzyme site. And the bases encircled by the vertical rectangular frame represent substitution site

图 2 糙果苋 ITS 序列 SNP 位点(仅列出部分序列)

Fig. 2 The SNP of ITS sequences of *Amaranthus tuberculatus*



M: DNA Marker DL2000; 1: 北美苋; 2: 反枝苋; 3: 菱叶苋; 4: 皱叶苋; 5: 胀果苋; 6: 刺苋; 7: 长芒苋; 8~12: 西部苋; 13: 糙果苋; 14~15: 西部苋; 16~20: 糙果苋
M: DNA Marker DL2000; 1: *Amaranthus blitoides*; 2: *A. retroflexus*; 3: *A. standleyanus*; 4: *A. crispus*; 5: *A. deflexus*; 6: *A. spinosus*; 7: *A. palmeri*; 8-12: *A. rudis*; 13: *A. tuberculatus*; 14-15: *A. rudis*; 16-20: *A. tuberculatus*

图 3 苋属植物 ITS 616 序列酶切电泳图

Fig. 3 The electropherogram of enzyme-digested products of ITS 616 sequence

通过 ITS 序列,将长芒苋与西部苋和糙果苋复合群与苋属其他物种区分后,再根据 SNP 位点对西部苋和糙果苋进行辅助判定。形态上,西部苋雌株胞果周裂、1~2 花被片、雌花花序间生有小叶、叶片黄绿或绿色并长椭圆形,与糙果苋雌株胞果不裂、无花被片、雌花花序细长无小叶、叶片深绿色并狭长椭圆形的特征相区别,但雄株间的形态却十分接近。二者在 ITS 序列上有稳定的 SNP 位点,且为杂合位点,而且变异位点较少。因此,综合形态特征和 ITS

序列分析,建议采用 Costea 和 Tardif^[8] 的分类观点,即将西部苋作为糙果苋的变种 *A. tuberculatus* (Moq.) Sauer var. *rudis* (Sauer) Costea & Tardif 来处理。

参考文献

[1] Ward S M, Webster T M, Steckel L E. Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*): A review [J]. Weed Technology, 2013, 27(1): 12-27.
[2] Bensch C N, Horak M J, Peterson D. Interference of redroot

- pigweed (*Amaranthus retroflexus*), palmer amaranth, and common waterhemp (*A. rudis*) in soybean [J]. Weed Science, 2003, 51: 37–43.
- [3] 徐哈, 宋云, 范晓虹, 等. 3 种异株苋亚属杂草入侵风险及其在我国适生性分析[J]. 植物检疫, 2013, 27(4): 20–23.
- [4] Sauer J D. The grain amaranths and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey [J]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1967, 54(2): 103–137.
- [5] Sauer J D. The dioecious amaranths: a new species name and major range extensions [J]. Madroño, 1972, 21: 426–434.
- [6] Robertson K R. The genera of Amaranthaceae in the South-eastern United States [J]. Journal of the Arnold Arboretum, 1981, 62: 267–313.
- [7] Pratt D B, Clark L G. *Amaranthus rudis* and *A. tuberculatus*. One species or two? [J]. Journal of the Torrey Botanical Society, 2001, 128(3): 282–296.
- [8] Costea M, Tardif F J. Conspectus and notes on the genus *Amaranthus* (Amaranthaceae) in Canada [J]. Rhodora, 2003, 105 (923): 260–281.
- [9] 徐哈, 李振宇, 廖芳, 等. 苋属杂草种子形态学研究[J]. 植物检疫, 2014, 28(2): 33–38.
- [10] Gutell R R, Fox G E. A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(S): 175–269.
- [11] Konieczny A, Ausubel F M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based marker [J]. Plant Journal, 1993, 4(2): 403–410.
- [12] Rafalski A. Application of single nucleotide polymorphisms in crop genetics [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5 (2): 94–100.
- [13] Morin P A, Luikart G, Wayne R K, et al. SNPs in ecology, evolution and conservation [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2004, 19(4): 208–216.
- [14] 宋葆华, 张荃, 张慧, 等. 基于 RAPD 指纹图谱重构苋属系统发育关系[M]//中国植物学会六十五周年年会学术报告及论文摘要汇编(1933–1998). 北京: 中国林业出版社, 1998: 116.
- [15] 宋葆华, 陈之端, 汪小全, 等. 中国苋属 nrDNA 的 ITS 序列分析及其系统学意义[J]. 植物学报, 2000, 42(11): 1184–1189.
- [16] 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]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1995, 82: 247–277.
- [17] 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): 8369–8374.
- [18] Törjök O, Berger D, Meyer R C, et al. Establishment of a high efficiency SNP-based framework marker set for *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2003, 36: 122–140.
- [19] Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, et al. Development of PCR based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108: 1212–1220.
- [20] Rickert A M, Kim J H, Meyer S, et al. First-generation SNP/In-Del markers tagging loci for pathogen resistance in the potato genome [J]. Plant Biotechnology Journal, 2003, 1(6): 399–410.
- [21] Li Xiwen, Yang Yang, Henry R J, et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome [J]. Biological Reviews, 2015, 90(1): 157–166.

(责任编辑: 杨明丽)

征订启事

欢迎订阅 2018 年《中国稻米》杂志

《中国稻米》是由农业部主管, 中国水稻研究所主办, 全国农业技术推广服务中心等单位协办的全国性水稻科学技术期刊, 兼具学术性、技术性、知识性、信息性等特点。2014 年被国家新闻出版广电总局认定为首批学术类期刊, 为中文核心期刊和中国科技核心期刊, 曾荣获全国农业期刊金犁奖技术类一等奖、浙江省优秀科技期刊二等奖等奖项。据《中国科技期刊引证报告》(核心版)统计,《中国稻米》2016 年的影响因子为 0.572。适合我国水稻产区各级技术人员及农业与粮食行政管理人员、科研教学人员和稻农阅读。本刊为双月刊, 标准大 16 开本, 单月 20 日出版。每期定价 10.00 元, 全年 60.00 元, 全国公开发行, 邮发代码: 32–31, 国内刊号: CN33–1201/S, 国际统一刊号: ISSN 1006–8082。欢迎新老读者到当地邮局订阅, 也可直接汇款到本刊编辑部订阅。

地址: 浙江省杭州市富阳区新桥水稻所路 28 号

邮编: 311400

E-mail: zgdm@163.com

网址: www.zgdm.net

电话: 0571–63370271, 63370368