

# 中甸刺玫的系统位置及杂交起源研究

王开锦<sup>1,2</sup>, 张婷<sup>1</sup>, 王其刚<sup>1</sup>, 晏慧君<sup>1</sup>, 邱显钦<sup>1</sup>, 李淑斌<sup>1</sup>, 张颢<sup>1</sup>, 唐开学<sup>1</sup>, 蹇洪英<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>云南省农业科学院花卉研究所/云南省花卉育种重点实验室/国家观赏园艺工程技术研究中心, 昆明 650205;

<sup>2</sup>云南大学生命科学学院, 昆明 650091)

**摘要:** 中甸刺玫 (*Rosa praelucens* Byhouwer) 是云南特有的高山花卉和耐低温的月季种质资源, 也是蔷薇属唯一有报道的 10 倍体的野生种。然而, 中甸刺玫的系统位置存在较大争议, 其起源也不清楚。本研究利用 5S rDNA 和 4 个叶绿体 DNA (cpDNA) 片段 (*psbA-atpH*, *rbcL*, *rpl16* 和 *trnL-F*) 来构建蔷薇属的系统关系, 明确中甸刺玫的系统位置; 通过与近缘物种的序列比对, 推测中甸刺玫的原始亲本。结果表明: 蔷薇属 50 个种 (变种) 的 5S rDNA 序列长度为 498 ~ 573 bp, 变异程度随物种表现出明显差异。cpDNA 片段中 *psbA-trnH* 变异较大, 4 个片段联合分析的矩阵长 2969 bp, 其中变异位点 153 个。基于 5S rDNA 的分子系统树和 4 个 cpDNA 片段联合分析的分子系统树中, 中甸刺玫均与桂味组的物种聚在一起, 与小叶组的刺梨亲缘关系较远, 其系统位置应从小叶组移至桂味组。中甸刺玫的十倍体起源很复杂, 细梗蔷薇、华西蔷薇、尾萼蔷薇、西南蔷薇和西北蔷薇是与其关系最近的野生近缘种, 其原始母本最可能是尾萼蔷薇、西南蔷薇和西北蔷薇的其中之一或共同母本, 细梗蔷薇和华西蔷薇极可能是其父本, 而尾萼蔷薇、西南蔷薇和西北蔷薇也可能以父本的身份参与了中甸刺玫的杂交物种形成。

**关键词:** 中甸刺玫; 蔷薇属; 5S rDNA; cpDNA; 系统位置; 杂交起源

## The Phylogenetic Position and Hybrid Origination of *Rosa praelucens* Byhouwer

WANG Kai-jin<sup>1,2</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, WANG Qi-gang<sup>1</sup>, YAN Hui-jun<sup>1</sup>, QIU Xian-qin<sup>1</sup>, LI Shu-bin<sup>1</sup>,  
ZHANG Hao<sup>1</sup>, TANG Kai-xue<sup>1</sup>, JIAN Hong-ying<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences/Yunnan Key Laboratory for Flower Breeding/  
National Engineering Research Center of Ornamental Horticulture, Kunming 650205;

<sup>2</sup>Life School of Yunnan University, Kunming 650091)

**Abstract:** *Rosa praelucens* Byhouwer, endemic to Yunnan, China, is a famous alpine flower and is highly tolerant to coldness. *Rosa praelucens* Byhouwer, as reported to date, is the only one decaploid rose species in the world. However, its phylogenetic position is still under debate and its origination is unclear yet. In this study, the phylogenetic position of *R. praelucens* Byhouwer was explored by reconstructing the phylogeny of 50 rose species/varieties based on 5S rDNA and 4 chloroplast DNA fragments, i. e., *psbA-atpH*, *rbcL*, *rpl16* and *trnL-F*. Its original ancestors were postulated by sequence alignment and base comparison with its closely related species. The sequence length of 5S rDNA ranged from 498 bp to 573 bp with significant variation among rose species. By analyzing 2969 bases in combination of 4 cpDNA fragments, 153 polymorphic sites were detected. Both phylogenetic trees revealed by either 5S rDNA or cpDNA fragments suggested that *R. praelucens* Byhouwer clustered with species from sect. *Cinnamomeae* DC. ex Ser., rather than *R. roxburghii* Tratt. of sect. *Microphyllae* Crép. *R. praelucens* Byhouwer should be placed in sect. *Cinnamomeae* DC. ex Ser. rather than sect. *Microphyllae* Crép. The origination of *R. praelucens* Byhouwer was very complex. *Rosa caudata* Baker, *R. murielae* Rehder & E. H. Wilson, *R. davidii* Crép., *R. graciliflora* Rehder & E. H. Wilson and *R.*

收稿日期: 2018-01-09 修回日期: 2018-01-25 网络出版日期: 2018-05-22

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180521.1755.005.html>

基金项目: 国家自然科学基金 (31560301, 31260198)

第一作者主要从事蔷薇属系统发育研究。E-mail: kjwang@aliyun.com

通信作者: 唐开学, 主要从事月季遗传育种研究。E-mail: kxtang@hotmail.com

蹇洪英, 主要从事蔷薇属种质资源及系统发育研究。E-mail: ynwildflower@aliyun.com

moyesii Hemsl. & E. H. Wilson were closely related to *R. praelucens* Byhouwer. One of *R. caudata* Baker, *R. murielae* Rehder & E. H. Wilson and *R. davidii* Crép. or their common maternal ancestor was most likely to be the maternal ancestor of *R. praelucens* Byhouwer. Both *R. graciliflora* Rehder & E. H. Wilson and *R. moyesii* Hemsl. & E. H. Wilson were most likely to be its paternal ancestors, but *R. caudata* Baker, *R. murielae* Rehder & E. H. Wilson and *R. davidii* Crép. might also have participated the hybrid origination of *R. praelucens* Byhouwer as paternal parents.

**Key words:** *Rosa praelucens* Byhouwer; *Rosa* L.; 5S rDNA; cpDNA; phylogenetic position; hybrid origination

全世界约有蔷薇属(*Rosa* L.)植物 200 种,广泛分布于亚热带和北温带<sup>[1-2]</sup>,其染色体数量从二倍体( $2n = 2x = 14$ )到八倍体( $2n = 8x = 56$ )<sup>[3]</sup>,甚至十倍体( $2n = 10x = 70$ )<sup>[4]</sup>。云南香格里拉县特有的中甸刺玫(*Rosa praelucens* Byhouwer)是至今为止唯一有报道的十倍体蔷薇属野生种<sup>[4]</sup>。仅狭域分布在香格里拉县小中甸地区的中甸刺玫是重要的高山观赏花卉<sup>[5-8]</sup>和耐低温的月季种质资源<sup>[9]</sup>,也是一种具有开发利用前景的食果植物资源<sup>[10-11]</sup>。但由于现存个体较少、种群小、分布区域狭窄,中甸刺玫已成为‘极危’植物<sup>[12-13]</sup>。因此,对中甸刺玫的研究在物种进化、生物保护及开发利用等多方面具有十分重要的意义。

中甸刺玫的分类地位存在较大争议。《中国植物志》把中甸刺玫归于小叶组(sect. *Microphyllae* Crép.),同时也提出其与玫瑰(*R. rugosa* Thunb.)有若干相似之处,可作为小叶组与桂味组(sect. *Cinnamomeae* DC. ex Ser.)的中间连索<sup>[1]</sup>,其他分类学家也认为它是小叶组和桂味组之间的过渡类型<sup>[2,14-15]</sup>。基于 SSR 的研究表明中甸刺玫与小叶组的刺梨(*R. roxburghii* Tratt.)聚在一起<sup>[16-17]</sup>,但基于 ITS、*matK*、*psbA-trnH*、*trnL* 和 *trnG* 等序列分析的结果却表明中甸刺玫和桂味组的蔷薇聚在一起<sup>[16,18-19]</sup>。

中甸刺玫的起源也尚不明确。Jian 等<sup>[4]</sup>根据染色体形态和细胞核型提出它是一个异源十倍体,多

倍化和种间杂交在其形成过程中可能发挥着重要的作用。Fougère-Danezan 等<sup>[19]</sup>也认可这种观点,并认为其异源十倍体可能是刺梨与桂味组所在大支(Cinnamomeae Clade)中的至少一个种发生一次或多次杂交的结果。但已有的研究并没有明确究竟有哪些种参与了它的物种形成,其杂交和多倍化的具体过程也不清楚。

为了确定中甸刺玫的系统位置及其十倍体形成过程,明确哪些种参与了它的多倍化前或多倍化后的杂交物种形成,本研究利用 5S rDNA 基因和 4 个 cpDNA 片段来构建中甸刺玫与同域分布在云南的其他蔷薇属植物的系统关系,并根据它与最近亲缘关系的物种之间在 5S rDNA 及 cpDNA 片段的序列差异及特征推测其父系和母系亲本。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选择中甸刺玫以及分布在中国特别是云南的 49 个其他蔷薇属的种(变种)为试验材料(表 1),其中,中甸刺玫选取了在小叶数、花色和花型等方面具有显著变异的 8 个野生植株和 1 个通过嫁接长期保存于资源圃中的植株。除 8 株野生中甸刺玫植株外,所有材料均以活体形式保存于位于昆明市北郊的云南省农业科学院花卉研究所月季种质资源圃。

表 1 试验材料的来源及染色体数量

Table 1 Geological information and chromosome number of the test materials

种 Species	倍性 Ploidy	来源 Location
小叶组 Sect. <i>Microphyllae</i> Crép.		
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(JD)	$2n = 10x = 70$ <sup>[4]</sup>	中国云南香格里拉小中甸
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(RST)		中国云南香格里拉小中甸
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(TMG)		中国云南香格里拉小中甸
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(XZDL)		中国云南香格里拉小中甸
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(NNK)		中国云南香格里拉小中甸
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(HP)		中国云南香格里拉小中甸
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(BHGL)		中国云南香格里拉小中甸
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(DRG)		中国云南香格里拉小中甸
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer(CDXYT)		中国云南香格里拉小中甸

表 1(续)

种 Species	倍性 Ploidy	来源 Location
刺梨 <i>R. roxburghii</i> Tratt.	$2n = 2x = 14$ [20-22]	中国云南宁蒗永宁
合柱组 Sect. <i>Synstylae</i> DC.		
川滇蔷薇 <i>R. soulieana</i> Crép.	$2n = 2x = 14$ [22-23]	中国云南香格里拉尼西
复伞房蔷薇 <i>R. brunonii</i> Lindl.	$2n = 2x = 14$ [22-24]	中国云南维西澜沧江边
卵果蔷薇 <i>R. helenae</i> Rehder & E. H. Wilson	$2n = 2x = 14$ [20]	中国云南丽江玉龙雪山
维西蔷薇 <i>R. weisiensis</i> T. T. Yu & T. C. Ku	$2n = 2x = 14$ [22]	中国云南维西巴迪
丽江蔷薇 <i>R. lichiangensis</i> T. T. Yu & T. C. Ku	$2n = 2x = 14, 2n = 4x = 28$ [15, 25]	中国云南丽江木家桥
德钦蔷薇 <i>R. deqenensis</i> Rehder & E. H. Wilson	无报道	中国云南香格里拉尼西
得荣蔷薇 <i>R. derongensis</i> T. C. Ku	$2n = 2x = 14$ [26]	中国云南德钦-明永冰川
长尖叶蔷薇 <i>R. longicuspis</i> Bertol.	$2n = 2x = 14$ [22-23]	中国云南丽江木家桥
软条七蔷薇 <i>R. henryi</i> Boulenger	$2n = 2x = 14$ [24]	中国云南会泽毛家村
七姊妹 <i>R. multiflora</i> var. <i>carnea</i> Thory	$2n = 2x = 14, 2n = 3x = 21$ [27]	中国云南昆明
野蔷薇 <i>R. multiflora</i> Thunb. var. <i>multiflora</i>	$2n = 2x = 14$ [22, 28]	中国云南晋宁
毛萼蔷薇 <i>R. lasiosepala</i> F. P. Metcalf	$2n = 2x = 14$ [22]	中国云南麻栗坡
绣球蔷薇 <i>R. glomerata</i> Rehder & E. H. Wilson	$2n = 2x = 14$ [24]	中国云南贡山高黎贡山
桂味组 Sect. <i>Cinnamomeae</i> DC. ex Ser.		
多腺小叶蔷薇 <i>R. willmottiae</i> var. <i>glandulifera</i> T. T. Yu & T. C. Ku	$2n = 2x = 14$ [26]	中国云南丽江干河坝
钝叶蔷薇 <i>R. sertata</i> Rolfe	$2n = 2x = 14, 2n = 4x = 28$ [20, 22, 24]	中国云南香格里拉白水台
大叶蔷薇 <i>R. macrophylla</i> Lindl.	$2n = 2x = 14, 2n = 4x = 28, 2n = 6x = 42$ [22-23]	中国云南香格里拉石卡山
腺叶扁刺蔷薇 <i>R. sweginzowii</i> Koehne var. <i>glandulosa</i> Cardot	$2n = 6x = 42$ [26]	中国云南香格里拉石卡山
刺蔷薇 <i>R. acicularis</i> Lindl.	$2n = 6x = 42, 2n = 8x = 56$ [16, 29]	中国云南德钦白马雪山
华西蔷薇 <i>R. moyesii</i> Hemsl. & E. H. Wilson	$2n = 6x = 42$ [20, 22, 24]	中国云南维西叶枝
铁杆蔷薇 <i>R. prattii</i> Hemsl.	$2n = 2x = 14$ [30]	中国云南丽江干河坝
西南蔷薇 <i>R. murielae</i> Rehder & E. H. Wilson	$2n = 2x = 14$ [26]	中国云南宁蒗泸沽湖
西北蔷薇 <i>R. davidii</i> Crép.	$2n = 2x = 14$ [16]	中国云南德钦明永冰川
粉蕾木香 <i>R. pseudobanksiae</i> T. T. Yu & T. C. Ku	$2n = 2x = 14$ [22]	中国云南弥渡武邑村
全针蔷薇 <i>R. persetosia</i> Rolfe	$2n = 2x = 14$ [20]	中国云南香格里拉纳帕海
弯刺蔷薇 <i>R. beggeriana</i> Schrenk ex Fisch. & C. A. Mey	$2n = 2x = 14$ [16]	中国新疆
双花蔷薇 <i>R. sinobiflora</i> T. C. Ku	无报道	中国云南贡山县高黎贡山
玫瑰 <i>R. rugosa</i> Thunb.	$2n = 2x = 14$ [16]	中国山东
尾萼蔷薇 <i>R. caudata</i> Baker	$2n = 2x = 14$ [16]	中国云南香格里拉石卡山
芹叶组 Sect. <i>Pimpinellifoliae</i> DC. ex Ser.		
细梗蔷薇 <i>R. graciliflora</i> Rehder & E. H. Wilson	无报道	中国云南香格里拉联合村
峨眉蔷薇 <i>R. omeiensis</i> Rolfe f. <i>omeiensis</i>	$2n = 2x = 14$ [20, 22]	中国云南丽江玉龙雪山
腺叶峨眉蔷薇 <i>R. omeiensis</i> f. <i>glandulosa</i> T. T. Yu & T. C. Ku	$2n = 2x = 14$ [26]	中国云南德钦白马雪山
绢毛蔷薇 <i>R. sericea</i> Lindl. f. <i>sericea</i>	$2n = 2x = 14$ [20, 22]	中国云南丽江玉龙雪山
毛叶蔷薇 <i>R. mairei</i> H. Lévl.	$2n = 2x = 14$ [22]	中国云南维西托枝
中甸蔷薇 <i>R. zhongdianensis</i> T. C. Ku	$2n = 2x = 14$ [22]	中国云南香格里拉尼西
单瓣黄刺玫 <i>R. xanthina</i> f. <i>normalis</i> Rehder & E. H. Wilson	$2n = 2x = 14$ [16]	中国河北

表 1(续)

种 Species	倍性 Ploidy	来源 Location
倭江蔷薇 <i>R. taronensis</i> T. T. Yu	无报道	中国云南贡山高黎贡山
月季组 Sect. <i>Chinenses</i> DC. ex Ser.		
桔黄香水月季 <i>R. odorata</i> var. <i>pseudindica</i> (Lindl.) Rehder	$2n = 2x = 14$ <sup>[31]</sup>	中国云南丽江新主
粉红香水月季 <i>R. odorata</i> var. <i>erubescens</i> (Focke) T. T. Yu & T. C. Ku	$2n = 2x = 14$ <sup>[31]</sup>	中国云南宁蒗红桥
粉红香水月季 <i>R. odorata</i> var. <i>erubescens</i> (Focke) T. T. Yu & T. C. Ku	$2n = 3x = 21$ <sup>[31]</sup>	中国云南丽江木家桥
大花香水月季 <i>R. odorata</i> var. <i>gigantea</i> (Collett ex Crép.) Rehder & E. H. Wilson	$2n = 2x = 14, 2n = 3x = 21$ <sup>[20,31-32]</sup>	中国云南昆明小河
单瓣月季花 <i>R. chinensis</i> var. <i>spontanea</i> (Rehder & E. H. Wilson) T. T. Yu & T. C. Ku	$2n = 2x = 14$ <sup>[33]</sup>	美国(TAMU 赠送)
紫月季花 <i>R. chinensis</i> var. <i>semperflorens</i> (Curtis) Koehne	$2n = 2x = 14$ <sup>[16]</sup>	中国云南大理
木香组 Sect. <i>Banksianae</i> Lindl.		
单瓣白木香 <i>R. banksiae</i> var. <i>normalis</i> Regel	$2n = 2x = 14$ <sup>[22]</sup>	中国云南大理松桂
黄木香花 <i>R. banksiae</i> var. <i>lutea</i> Lindl.	$2n = 2x = 14$ <sup>[20,22]</sup>	中国云南昆明
木香花 <i>R. banksiae</i> R. Br. var. <i>banksiae</i>	$2n = 2x = 14$ <sup>[22,27,34]</sup>	中国云南丽江白沙
小果蔷薇 <i>R. cymosa</i> Tratt.	$2n = 2x = 14$ <sup>[20,31]</sup>	中国云南西畴董干
金樱子组 Sect. <i>Laevigatae</i> Thory		
金樱子 <i>R. laevigata</i> Michx	$2n = 2x = 14$ <sup>[20,22,35]</sup>	中国云南富宁
硕苞组 Sect. <i>Bracteatae</i> Thory		
硕苞蔷薇 <i>R. bracteata</i> J. C. Wendl.	$2n = 2x = 14$ <sup>[22,30]</sup>	中国云南陇川

## 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA 提取及纯化** 采用 TianGen DP305 基因组提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)进行基因组 DNA 提取,用 BioTeke DP1501(北京百泰克生物技术有限公司)试剂盒进行 DNA 纯化,用 Nanodrop 2000 进行 DNA 浓度和纯度检测。

**1.2.2 5S rDNA 扩增及克隆** 5S rDNA 基因采用 PCR 扩增获得。引物序列为 F:5'-GAG AGT AGT ACT AGG ATG GGT GAC C-3', R:5'-CTC TCG CCC AAG AAC GCT TAA CTG C-3'<sup>[36]</sup>, 退火温度为 58 °C。扩增产物部分用于直接测序,部分经胶回收、连接、转化、筛选阳性克隆后,每个样本送 5 个单克隆菌液至昆明硕擎生物科技有限公司进行双向测序。

**1.2.3 cpDNA 扩增** 4 个 cpDNA 片段亦采用 PCR 扩增获得。*psbA-trnH* 的引物序列为 F:5'-GTTATG-CATGAACGTAATGCTC-3', R: 5'-CGCGCATGGTG-GATTCACAATCC-3'<sup>[37]</sup>。*rbcl* 引物序列为 F:5'-ATGTCACCACAAACAGAAAG-3', R: 5'-TCGCATGTAC-CTGCAGTAGC-3'<sup>[38]</sup>。*rpl16* 引物序列为 F:5'-GC-TATGCTTAGTGTGACTCGTTG-3', R: 5'-CCCT-TCATTCTTCCTCTATGTTG-3'<sup>[39]</sup>。*trnL-F* 引物序列为 F:5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3', R:5'-ATT TGAAGTGGTGACACGAG-3'<sup>[40]</sup>。其中 *rbcl*、*rpl16* 和

*trnL-F* 的退火温度为 56 °C, *psbA-trnH* 的退火温度为 52 °C。PCR 产物直接送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

**1.2.4 数据处理** 在利用基因序列来构建蔷薇属系统关系时,大多研究者采用 PCR 产物直接测序与大量单克隆测序相结合的办法来确定序列<sup>[19,41-42]</sup>。但本试验中大部分 5S rDNA 的 PCR 产物测序未能获得完整长度的序列,因此,在数据分析时利用单克隆序列来建树。数据处理参照 Fougère-Danezan 等<sup>[19]</sup>和 Zhu 等<sup>[42]</sup>的方法:同一个种的 5 个克隆序列,经序列比对后,逐一对单核苷酸多态性(SNPs)进行核实,当两个及两个以上单克隆某位点的单核苷酸变异相同时,该变异位点有效,否则视为 PCR 错误。如果两个及两个以上单克隆序列一致时,这些序列被视为一条序列用于后续分析,最后每个种保留了 1 条或 2 条(2 倍体)至 5 条序列(多倍体)进行系统树构建。4 个 cpDNA 均获得较理想的 PCR 产物序列,去除两侧不整齐的序列后,将 4 个片段进行联合分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于 5S rDNA 的结果

50 个种(变种)蔷薇属植物的 5S rDNA 序列长

度为 498 ~ 573 bp, 变异程度随物种表现出明显差异。如木香花 5 个克隆序列的长度均为 527 bp, 单克隆间没有检测到位点变异, 而单瓣黄刺玫 5 个克隆构成的序列矩阵长 559 bp, 有 131 个碱基突变位点 (23.4%), 13 个插入/缺失。5S rDNA 在种间的差异也比较明显, 50 个种 (变种) 用于构建系统树的 138 条序列构成的矩阵长 708 bp, 共检测出 312 个碱基突变位点 (44.1%), 简约信息位点 254 个 (35.9%)。

基于 HKY + G 模型的贝叶斯系统树 (图 1) 显示: 整体上, 中甸刺玫的 9 个个体、桂味组的大部分蔷薇、芹叶组的细梗蔷薇和求江蔷薇形成一个大分支 (Cinnamomeae Clade)。在这个大分支中, 中甸刺玫 8 个代表个体 (RST、TMG、XZDL、NNK、HP、BHGL、DRG、CDXYT) 的所有单克隆序列和基地保存的活体材料 (JD) 的 3 条克隆序列 (克隆 1、2 和 3) 与细梗蔷薇 (2 条)、华西蔷薇 (5 条) 以 92% 的支持率构成一个小分支 (Clade 1)。JD 的第 5 条克隆序列与多腺小叶蔷薇 (克隆 1)、西南蔷薇 (克隆 2)、钝叶蔷薇 (克隆 1 和 2)、尾萼蔷薇、刺蔷薇 (克隆 2) 及腺叶扁刺蔷薇 (克隆 3) 聚成第 2 个小分支, 但支持率较低 (Clade 2)。JD 的第 4 条克隆序列单独形成一个小分支 (Clade 3)。

根据基于 5S rDNA 构建的系统树 (图 1), 中甸刺玫与华西蔷薇、细梗蔷薇、多腺小叶蔷薇、西南蔷薇、钝叶蔷薇、尾萼蔷薇、腺叶扁刺蔷薇、西北蔷薇以及刺蔷薇的亲缘关系较近。将中甸刺玫的 44 个单克隆作为整体, 与这些亲缘关系较近的物种进行序列比对, 结果表明细梗蔷薇与中甸刺玫共有 2 个特有片段 (图 2) 和 4 个特有碱基 (表 2), 而华西蔷薇与其共有 3 个特有的碱基 (表 2)。因此, 细梗蔷薇、华西蔷薇或二者各自的亲本都很有可能是中甸刺玫的原始亲本。剩余序列除尾萼蔷薇、西南蔷薇 (克隆 2)、西北蔷薇 (克隆 1) 与中甸刺玫整体相比无明显差异位点外, 其他种都有不同程度的变异: 多腺小叶蔷薇 (克隆 1)、腺叶扁刺蔷薇 (克隆 2)、刺蔷薇 (克隆 2) 有 1 个差异位点; 刺蔷薇 (克隆 1) 有 2 个差异位点; 腺叶扁刺蔷薇 (克隆 3) 有 4 个差异位点; 钝叶蔷薇 (克隆 2) 有 2 个片段共 8 个碱基的缺失; 钝叶蔷薇 (克隆 1) 有 2 个片段共 8 个碱基的缺失和 2 个差异位点 (图 2)。因此, 细梗蔷薇、华西蔷薇、尾萼蔷薇、西南蔷薇 (克隆 2) 和西北蔷薇 (克隆 1) 与中甸刺玫有更近的亲缘关系, 其中细梗蔷薇和华西蔷薇极有可能参与了中甸刺玫的物种形成。

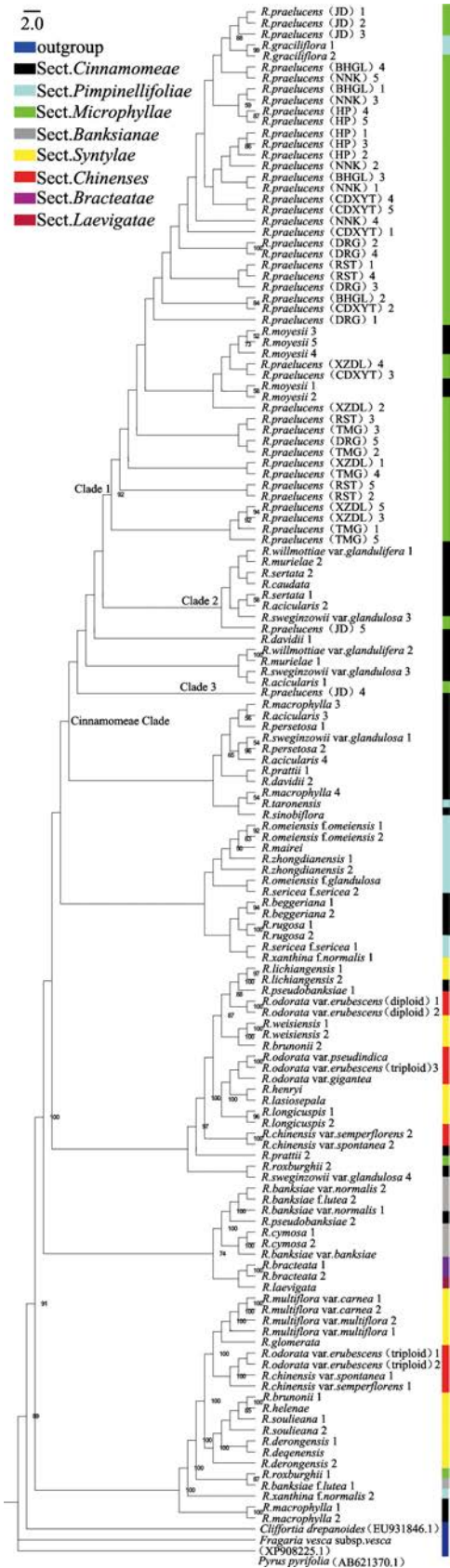


图 1 蔷薇属部分植物基于 5S rDNA 序列的贝叶斯系统发育树

Fig. 1 Bayesian phylogenetic tree of some *Rosa* species based on 5S rDNA

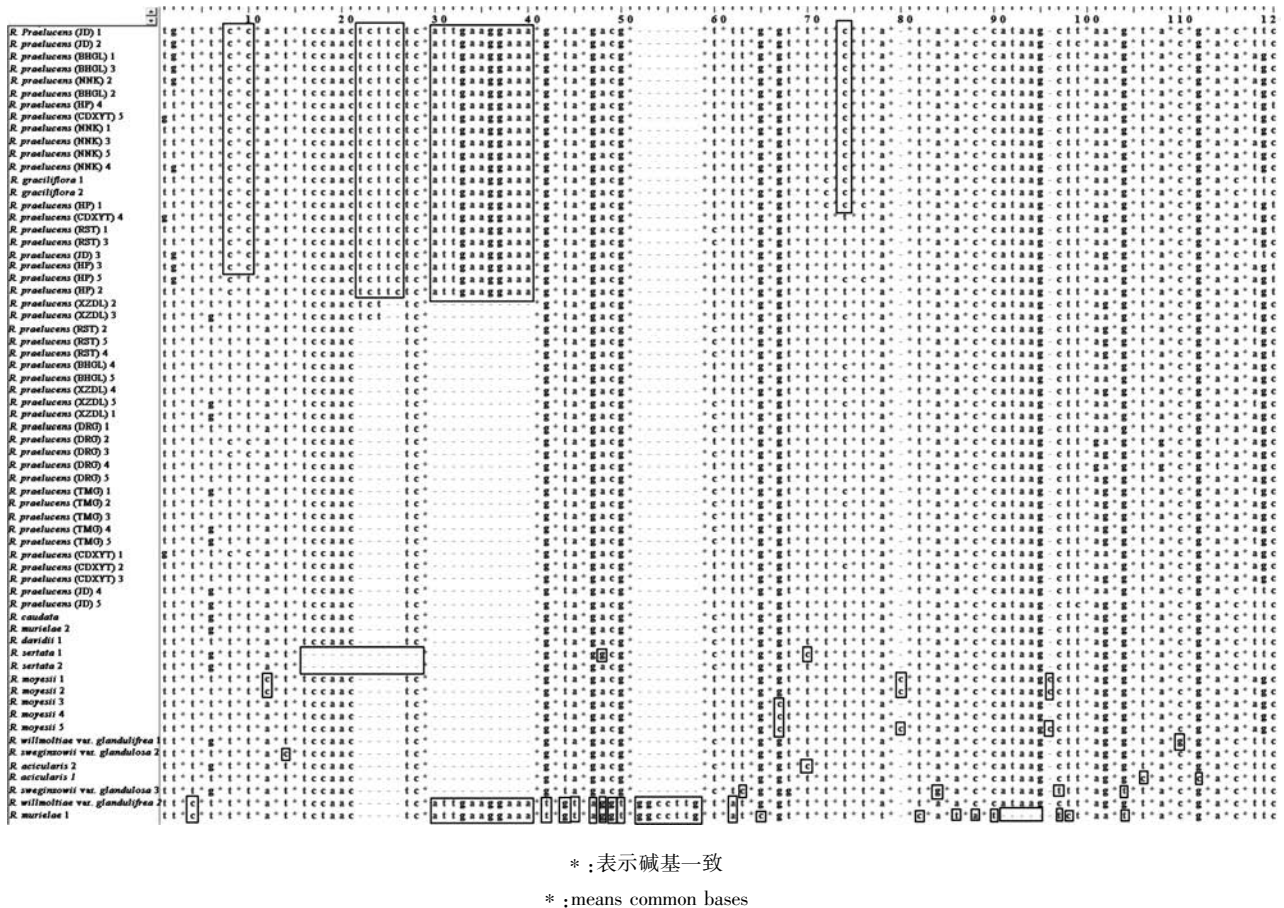


图 2 中甸刺玫与近缘种的 5S rDNA 序列差异比较

Fig. 2 5S rDNA sequences alignment and comparison among *R. praelucens* and other closely related rose species

表 2 中甸刺玫及其近缘种的重要杂合位点

Table 2 Important heterozygous loci of *R. praelucens* and other closely related rose species

种 Species	8 bp	10 bp	74 bp	102 bp	116 bp	118 bp	119 bp
中甸刺玫 <i>R. praelucens</i> Byhouwer	C/T	C/T	C/T	A/G	A/C	T/A	G/T
细梗蔷薇 <i>R. graciliflora</i> Rehder & E. H. Wilson	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	C	T	T
华西蔷薇 <i>R. moyesii</i> Hemsl. & E. H. Wilson	T	T	T	G	<u>A</u>	<u>T/A</u>	<u>G</u>
西南蔷薇 <i>R. muriei</i> Rehder & E. H. Wilson	T	T	T	G	C	T	T
西北蔷薇 <i>R. davidii</i> Crép.	T	T	T	G	C	T	T
多腺小叶蔷薇 <i>R. willmottiae</i> var. <i>glandulifera</i> T. T. Yu & T. C. Ku	T	T	T	G	C	T	T
腺叶扁刺蔷薇 <i>R. sweginowii</i> var. <i>glandulosa</i> Cardot	T	T	T	G	C	T	T
尾萼蔷薇 <i>R. caudata</i> Barker	T	T	T	G	C	T	T
刺蔷薇 <i>R. acicularis</i> Lindl.	T	T	T	G	C	T	T
钝叶蔷薇 <i>R. sertata</i> Rolfe	T	T	T	G	C	T	T

2.2 基于 4 个叶绿体 DNA 片段联合分析的结果

试验所涉及的 4 个叶绿体 DNA 片段中, *rbcl*、*rpl16* 和 *trnL-F* 相对保守, *psbA-trnH* 变异较大。 *rbcl* 矩阵长 635 bp, 有 14 个碱基突变位点(2.2%), 无插入/缺失, 简约信息位点 6 个(0.9%)。 *rpl16* 矩阵长

932 bp, 有 39 个碱基突变位点(4.2%), 4 个插入/缺失, 简约信息位点 19 个(2.0%)。 *trnL-F* 矩阵长 930 bp, 有 38 个碱基突变位点(4.1%), 3 个缺失/插入, 简约信息位点 18 个(1.9%)。 *psbA-trnH* 矩阵长 443 bp, 有 93 个碱基突变位点(21%), 9 个缺失/插

人,简约信息位点 50 个(11.3%)。4 个片段联合分析的矩阵长 2969 bp,有 153 个碱基突变位点(5.2%),17 个缺失/插入,简约信息位点 68 个(2.3%)。

基于 K81uf + G 模型的 4 个 cpDNA 片段构建的贝叶斯系统树(图 3)显示:整体上,中甸刺玫的 9 个个体与除粉蔷薇木香外的桂味组的所有蔷薇、芹叶组的细梗蔷薇以 100% 的支持率形成一个大的分支(Cinnamomeae Clade)。其中,中甸刺玫 8 个代表性野生个体中的 7 个(XZDL、HP、NNK、BHGL、TMG、RST、DRG)及基地材料(JD)以 92% 的支持率形成一个小分支(Clade 1);另一个代表性野生个体(CDXYT)与桂味组的蔷薇构成另一个小分支

(Clade 2)。

基于 4 个 cpDNA 片段联合分析的系统树(图 3),把中甸刺玫与除粉蔷薇木香外桂味组的所有蔷薇和芹叶组的细梗蔷薇进行序列比对,结果表明,与中甸刺玫 9 个序列构成的整体相比,细梗蔷薇、多腺小叶蔷薇和华西蔷薇差异位点较多,亲缘关系较远,可以排除是其母本的可能。而钝叶蔷薇、大叶蔷薇、腺叶扁刺蔷薇、刺蔷薇、尾萼蔷薇、全针蔷薇、西南蔷薇、西北蔷薇和铁杆蔷薇等物种与中甸刺玫的整体序列相比并无差异(图 4)。因此,它们与中甸刺玫可能拥有共同的母系祖先,或者其中至少一个种可能是中甸刺玫的原始母本。

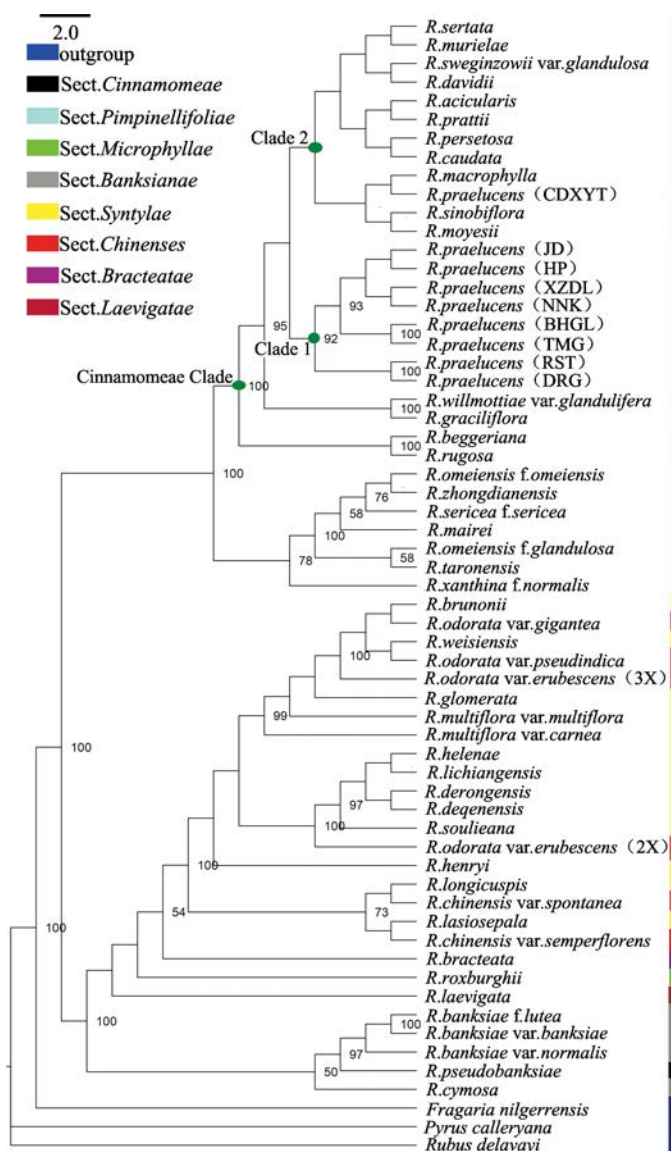


图 3 蔷薇部分植物基于 *psbA-atpH*、*rbcL*、*rpl16* 和 *trnL-F* 序列联合分析的贝叶斯系统发育树

Fig. 3 Bayesian phylogenetic tree of some *Rosa* species based on the combination of *psbA-atpH*, *rbcL*, *rpl16* and *trnL-F*

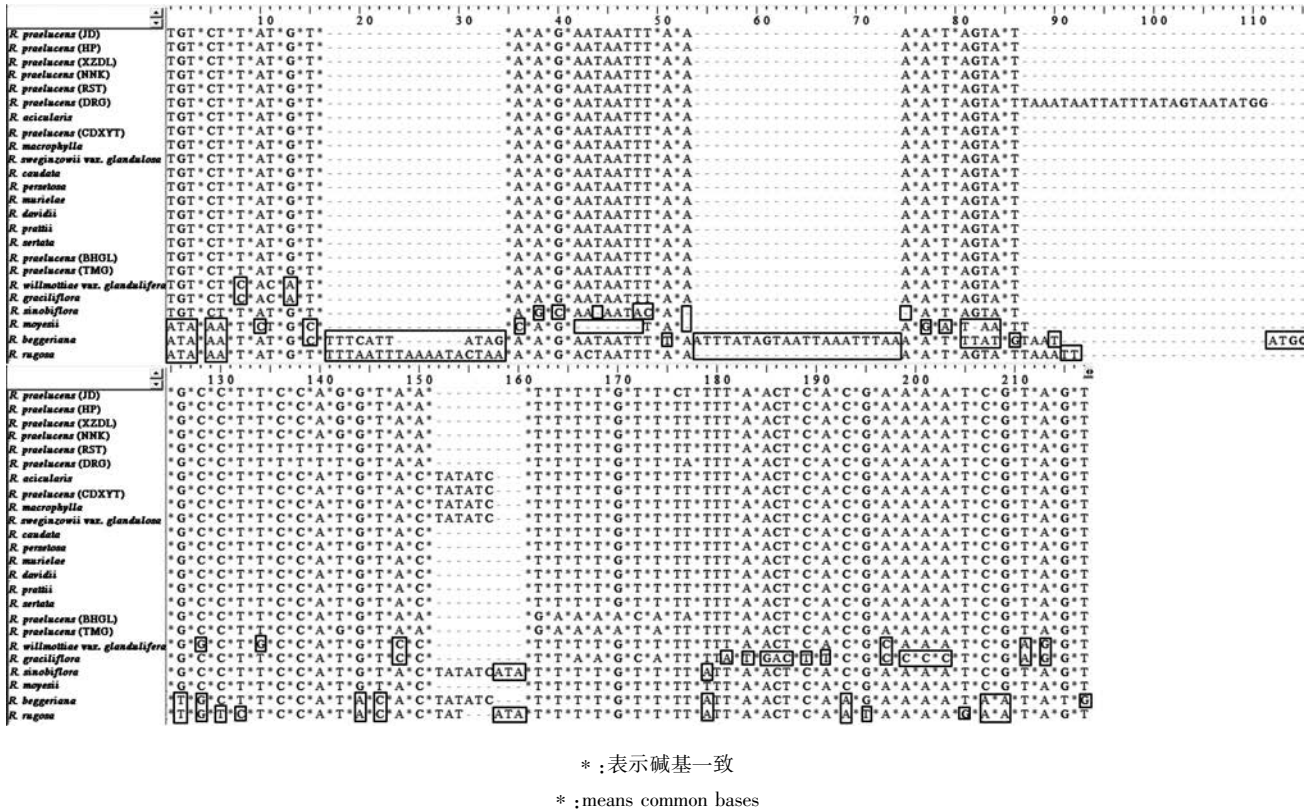


图4 中甸刺玫与近缘种的叶绿体 DNA 片段序列差异比较

Fig. 4 Alignment of cpDNA sequences among *R. praelucens* Byhouwer and other closely related rose species

### 3 讨论

#### 3.1 中甸刺玫的系统位置

在形态学上,小叶组的萼筒杯状,瘦果着生在基部凸起的花托上;而桂味组的萼筒坛状,瘦果着生在萼筒边周及基部<sup>[1]</sup>。但在已有文献中将中甸刺玫归于小叶组的原因并非基于小叶组与桂味组的根本区别——瘦果在萼筒内的着生方式,而是“花单生,萼筒有皮刺,扁球形,与小叶组的刺梨相近”,并都认为它可作为小叶组与桂味组的中间连索,是两个组之间的过渡类型<sup>[2,14-15]</sup>。在本研究基于5S rDNA和cpDNA片段的系统树中,中甸刺玫均位于桂味组分支内(图1和图3),这与前人的研究结果一致<sup>[16,18-19]</sup>。实际上,除了果扁球形且表面有刺从而与刺梨的果相似外,中甸刺玫的其他形态特征、高倍性和高海拔分布的特点都与桂味组的多倍体蔷薇种类相似。因此,应将中甸刺玫的系统位置从小叶组移至桂味组。

#### 3.2 中甸刺玫的杂交起源

种间杂交是物种形成的关键因素之一<sup>[43-45]</sup>,由杂交和基因组加倍形成异源多倍体是物种形成的重要模式<sup>[45]</sup>。杂交和多倍化也是蔷薇属植物变异和

物种形成的来源之一<sup>[46-47]</sup>,并可能是该属物种形成和系统演化的主要因素<sup>[48]</sup>。中甸刺玫是十倍体,5S rDNA(表2)和cpDNA片段序列比对(图4)的结果表明中甸刺玫的遗传背景和成种过程非常复杂,不仅是某两个种简单杂交或某一个种的染色体经简单加倍而来,至少经历了2次以上的杂交及相应的染色体加倍,这与前人关于其是异源十倍体的推论一致<sup>[4,19]</sup>,但本研究的结果表明小叶组的刺梨并未直接参与中甸刺玫的物种形成(图1和图3),这与Fougère-Danezan等<sup>[19]</sup>和邓亨宁<sup>[49]</sup>的结论不同。

基因序列的系统发育分析是研究自然杂交尤其是种间杂交最为常用的方法,也是鉴别手段的首选<sup>[44]</sup>。叶绿体基因组由于其母系遗传的特性常被用于判断杂交种的母本,而双亲遗传的核基因特别是核糖体ITS基因常被用于判断双亲的大致范围<sup>[50]</sup>。本研究中核糖体5S rDNA序列比对表明细梗蔷薇、华西蔷薇、尾萼蔷薇、西南蔷薇和西北蔷薇与中甸刺玫的亲缘关系很近,都有可能参与了中甸刺玫的物种形成,而细梗蔷薇和华西蔷薇为中甸刺玫提供了特有片段(图2)或单碱基(表2),极有可能是中甸刺玫的直接亲本。4个cpDNA片段的序列比对则表明钝叶蔷薇、尾萼蔷薇、西北蔷薇、铁杆



蔷薇、大叶蔷薇、腺叶扁刺蔷薇、刺蔷薇、全针蔷薇和西南蔷薇等与中甸刺玫的序列完全相同,暗示着它们与中甸刺玫有共同的原始母本或者至少其中之一可能是中甸刺玫的原始母本。由于 5S rDNA 既能反映父本也能反映母本的序列特征,而叶绿体 DNA 仅反映母本序列特征,对比 5S rDNA 和叶绿体 DNA 研究的结果,可以排除铁杆蔷薇、钝叶蔷薇、大叶蔷薇、腺叶扁刺蔷薇、刺蔷薇和全针蔷薇是中甸刺玫原始母本的可能性,而西南蔷薇、尾萼蔷薇和西北蔷薇的共同祖先或其中之一是中甸刺玫的原始母本,并推测细梗蔷薇和华西蔷薇极可能是中甸刺玫的父本。目前尚不能排除尾萼蔷薇、西南蔷薇和西北蔷薇是否也以父本的身份参与了中甸刺玫的十倍体形成。

从分布区来说,中甸刺玫目前仅分布于香格里拉的小中甸地区,研究中所用的细梗蔷薇和尾萼蔷薇与中甸刺玫的来源相同,而西南蔷薇和西北蔷薇的自然分布区也在滇西北,因此,它们参与了中甸刺玫的杂交物种形成是可能的。在杂交可能性上,虽然目前尚无这几个种间可相互杂交的报道,但蔷薇属的种间杂交比较容易且在自然界普遍存在<sup>[46-47]</sup>。然而,由于杂交和多倍化的过程尚不清楚,需进一步借助相应的细胞学手段,对中甸刺玫减数分裂时期的花粉母细胞进行荧光原位杂交(FISH)和基因组原位杂交(GISH)来明确全部的亲本物种和多倍化过程,并开展种间杂交试验来检验可能亲本间是否具有杂交亲和性。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志第 37 卷. 北京: 科学出版社, 1985: 360-445
- [2] Ku T C, Robertson K R. *Rosa* (Rosaceae) // Wu Z Y, Raven P H. Flora of China. Vol. 9. Beijing: Science Press. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2003: 339-381
- [3] Rowley G D. Chromosome studies and evolution in *Rosa*. Bulletin du botanique national belge, 1967, 37(1): 45-52
- [4] Jian H Y, Zhang H, Tang K X, Li S F, Wang Q G, Zhang T, Qiu X Q and Yan H J. Decaploidy in *Rosa praelucens* Byhouwer (Rosaceae) endemic to Zhongdian Plateau, Yunnan, China. Caryologia, 2010, 63(2): 162-167
- [5] Li X X, Zhou Z K. Endemic wild ornamental plants from North-Western Yunnan. HortScience, 2005, 40(6): 1612-1619
- [6] 白锦荣, 张启翔. 滇西北地区蔷薇属 (*Rosa* L.) 种质资源调查. 安徽农业科学, 2008, 36(25): 10847-10850
- [7] 白锦荣, 张启翔, 潘会堂. 云南滇西北地区蔷薇属 (*Rosa* L.) 植物资源调查与评价. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 218-223
- [8] 李树发, 李纯佳, 蹇洪英, 李淑斌, 熊劲, 李进昆, 唐开学. 云南香格里拉特有易危植物中甸刺玫的表型多样性. 园艺学报, 2013, 40(5): 924-932
- [9] 邓菊庆, 蹇洪英, 李淑斌, 王其刚, 郭余龙, 张颖. 几种云南特有蔷薇资源的抗寒性研究. 西南农业学报, 2013, 26(2): 723-727
- [10] 曹亚玲, 何永华, 李朝鑫. 蔷薇属 39 个野生种果实的维生素含量及其与分组的关系. 植物学报, 1996, 38(10): 822-827
- [11] 何永华, 曹亚玲, 李朝鑫. 华西蔷薇和中甸刺玫营养成分分析. 园艺学报, 1997, 24(2): 203-204
- [12] 周玉泉, 苏群, 张颖, 李树发, 唐开学, 蹇洪英. 极危植物中甸刺玫的分布及种群数量动态. 植物遗传资源学报, 2016, 17(4): 649-654
- [13] 覃海宁, 杨永, 董仕勇, 何强, 贾渝, 赵莉娜, 于胜祥, 刘慧圆, 刘博, 严岳鸿, 向建英, 夏念和, 彭华, 李振宇, 张志翔, 何兴金, 尹林克, 林余霖, 刘全儒, 侯元同, 刘演, 刘启新, 曹伟, 李建强, 陈世龙, 金效华, 高天刚, 陈文俐, 马海英, 耿玉英, 金孝锋, 常朝阳, 蒋宏, 蔡蕾, 臧春鑫, 武建勇, 叶建飞, 赖阳均, 刘冰, 林秦文, 薛纳新. 中国高等植物受威胁物种名录. 生物多样性, 2017, 25(7): 696-744
- [14] Byhower J T P. An enumeration of the rose of Yunnan. Journal of the Arnold Arboretum, 1929, 10: 84-107
- [15] Bricet H. Distribution and ecology/continental Asian and Japan // Roberts A, Debener T, Gudin S. Encyclopedia of rose sciences (1st edition). Oxford: Elsevier Science, 2003: 204-215
- [16] 唐开学. 云南蔷薇属种质资源研究. 昆明: 云南大学, 2009
- [17] 许凤, 李林, 邱显钦, 唐开学, 蹇洪英, 李树发, 王其刚, 张颖. 云南 39 个野生蔷薇种间遗传多样性的 SSR 分析. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(6): 83-87
- [18] Qiu X Q, Zhang H, Jian H Y, Wang Q G, Zhou N N, Yan H J, Zhang T, Tang K X. Genetic relationships of wildroses, old garden roses and modern roses based on internal transcribed spacers and *matK* sequence. HortScience, 2013, 48(12): 1445-1451
- [19] Fougère-Danezan M, Joly S, Brunenu A, Gao X F, Zhang L B. Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. Annals of Botany, 2014, 115(2): 275-291
- [20] Täckholm G. Zytologische studien uber die Gattung *Rosa*. Acta Horti Bergiani, 1922, 7: 97-381
- [21] Song R J, Li H Q. Analyses on karyotypes of roxburgh rose. Acta Botanica Sinica, 1989, 31(2): 155-157
- [22] Jian H Y, Zhang T, Wang Q G, Li S B, Zhang H, Tang K X. Karyological diversity of wild *Rosa* in Yunnan, Southwestern China. Genetic resources and crop evolution, 2013, 60: 115-127
- [23] Hurst C C. Differential polyploidy in the genus *Rosa* L. Z Indukt Abstammungs-Vererbungs Supplement, 1928, 2: 866-960
- [24] Roberts A V, Gladis T, Brumme H. DNA amounts of roses (*Rosa* L.) and their use in attributing ploidy levels. Plant Cell Reports, 2009, 28(1): 61-71
- [25] 宋文琴, 李秀兰, 陈永利. 苹果亚科的核型进化和系统关系研究 // 洪德元. 植物染色体研究. 北京: 科学出版社, 1989: 327-333
- [26] Jian H Y, Zhang T, Wang Q G, Yan H J, Qiu X Q, Zhou N N, Li S B, Chen M, Zhang H, Tang K X. Nuclear DNA content and 1Cx-value variations in genus *Rosa* L. Caryologia, 2014, 67(4): 273-280
- [27] 马燕, 陈俊愉. 蔷薇属若干花卉的染色体观察. 福建林学院学报, 1991, 11(2): 215-218
- [28] 陈瑞阳, 宋文琴, 李秀兰, 李懋学, 梁国鲁, 陈成彬. 中国主要经济植物基因组染色体图谱(第 3 册): 中国园林花卉植物染色体图谱. 北京: 科学出版社, 2003: 698
- [29] Lewis W H. A monograph of the genus *Rosa* in North America. I. *R. acicularis*. Brittonia, 1959, 11(1): 1-24
- [30] Darlington C D, Wylie A P. Chromosome atlas of flowering plants. London: George Allan & Unwin Ltd, 1955: 134-138
- [31] 蹇洪英, 张颖, 张婷, 李树发, 王其刚, 晏慧君, 邱显钦, 唐开学. 香水月季不同变种及核型的染色体分析. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 457-461
- [32] 马燕, 陈俊愉. 中国蔷薇属 6 个种的染色体研究. 广西植物, 1992, 12(4): 333-336

- [33] Koba T, Minoguchi T. Karyotype analysis and localization of 45S rRNA gene in *Rosa chinensis* var. *spontanea*. // Abstracts of the 50th Annual Meeting of the Society of Chromosome Research. Chromosome science, 1999; 3
- [34] 刘东华, 李懋学. 我国某些蔷薇属花卉的核型研究. 植物科学学报, 1985, 3(4): 403-408
- [35] Liu C Y, Wang G L, Xie Q L, Jin J, Liu G N. An study on the chromosome karyomorphology of 6 species in *Rosa*. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology, 2008, 35(6): 5-8
- [36] Akasaka M, Ueda Y, Koba T. Karyotype analyses of five wild rose species belonging to septet A by fluorescence in situ hybridization. Chromosome Science, 2003, 6: 17-26
- [37] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, Weigt L A, Janzen D H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8369-8374
- [38] Fay M F, Swensen S M, Chase M W. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). Kew Bulletin, 1997, 52(1): 111-120
- [39] Jordan W C, Courtney M W, Neigel J E. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae). American Journal of Botany, 1996, 83(4): 430-439
- [40] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant molecular biology, 1991, 17(5): 1105-1109
- [41] Meng J, Fourgère-Danezan M, Zhang L B, Li D Z, Yi T S. Untangling the hybrid origin of the Chinese tea roses: evidence from DNA sequences of single-copy nuclear and chloroplast genes. Plant Systematics and Evolution, 2011, 297: 157-170
- [42] Zhu Z M, Gao X F, Fourgère-Danezan M. Phylogeny of *Rosa* sections *Chinenses* and *Synstylae* (Rosaceae) based on chloroplast and nuclear markers. Molecular phylogenetics and Evolution, 2015, 87: 50-64
- [43] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants. London: Edward Arnold (publisher) Ltd, 1971
- [44] Arnold M L. Natural hybridization and evolution. Oxford: Oxford University Press, 1997
- [45] Soltis P S, Soltis D E. The role of hybridization in plant speciation. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60: 561-588
- [46] Wissemann V, Ritz C M. The genus *Rosa* (Rosaceae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of *nrITS-1* and *atpB-rbcL* intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. Botanical Journal of the Linnean Society, 2005, 147: 275-290
- [47] Joly S, Starr J R, Lewis W H, Bruneau A. Polyploid and hybrid evolution in roses east of the Rocky Mountains. American Journal of Botany, 2006, 93: 412-425
- [48] Wissemann V, Ritz C M. Evolutionary patterns and processes in the genus *Rosa* (Rosaceae) and their implications for host-parasite co-evolution. Plant Systematics and Evolution, 2007, 266(1-2): 79-89
- [49] 邓亨宁. 蔷薇属小叶组分子系统发育学及物种形成. 重庆: 西南大学, 2015
- [50] 王玉国. 自然杂交与物种形成. 生物多样性, 2017, 25(6): 565-576