

石蒜属种间亲缘关系 AFLP 分析

黄想安¹, 董美芳¹, 阎学燕², 尚富德^{1*}

1. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004

2. 开封市疾病预防控制中心, 河南 开封 475000

摘要: 目的 研究石蒜属 13 种 (含 2 变种) 植物的种间亲缘关系和同种不同采集地材料的遗传多样性, 为种质资源的开发利用提供分子佐证。方法 采用扩增长度多态性 (AFLP) 标记对石蒜属植物 20 份材料的基因组 DNA 进行种间亲缘关系研究。结果 从 33 对选择性扩增引物组合中筛选出 6 对, 共扩增得到 330 条清晰可统计的条带, 其中多态性条带为 320 条, 占总带数的 96.8%; AFLP 分子标记检测到石蒜属 20 份材料种间遗传相似系数为 0.38~0.89; AFLP 分子标记聚类结果显示同一采集地的材料亲缘关系更近; 石蒜属植物存在较丰富的遗传多样性。结论 AFLP 分子标记能有效区分石蒜属植物种间的亲缘关系。

关键词: 石蒜属; AFLP; 种间亲缘关系; 种质资源; 遗传多样性

中图分类号: R282.710

文章标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)-0148-05

Analysis of genetic relationships among species of *Lycoris* Herb. by AFLP markers

HUANG Xiang-an¹, DONG Mei-fang¹, YAN Xue-yan², SHANG Fu-de¹

1. College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China

2. Kaifeng Center For Disease Prevention and Control, Kaifeng 475000, China

Abstract: **Objective** To investigate the interspecific relationships among thirteen species (include two varieties) of *Lycoris* Herb. from different habitats and provide the evidence for evaluation and exploitation of the germplasm resources for *Lycoris* Herb. **Methods** The genetic diversities of 20 accessions of *Lycoris* Herb. from different habitats were investigated with the technique of amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Results** Six pairs of AFLP primers were selected from 33 pairs of combinations, and a total of 330 amplified clear DNA bands were obtained, among them 320 were polymorphic bands. The percentage of polymorphic bands was 96.8%. The coefficient ranges of interspecific genetic similarity (GS) in AFLP analyses for the 20 materials were 0.38—0.89. AFLP clustering results showed that the materials from the same habitats had a closer genetic relationship. There were abundant genetic diversity in species of *Lycoris* Herb. **Conclusion** AFLP technique is efficient in generating more accurate information on the genetic diversity and relationship in plants of *Lycoris* Herb.

Key words: *Lycoris* Herb.; AFLP; interspecific relationship; germplasm resources; genetic diversity

石蒜属 *Lycoris* Herb. 系单子叶植物纲石蒜科 (Amaryllidaceae) 多年生球根蓝本植物。石蒜属植物全世界有 20 多种, 主要分布于中国、日本和韩国, 少数产于缅甸、朝鲜、尼泊尔和印度尼西亚等国。我国有 16 种 (含 2 变种), 主要分布在长江以南地区^[1]。江苏、浙江、安徽是我国石蒜属资源的分布中心, 而江苏省分布最多, 有 13 种 (含 1 变种)^[2]。石蒜属植物具有较高的药用价值, 开发应用前景广阔。由于石蒜属植物花叶两不相见, 传统分类鉴定

需要花费相对较长的时间来观察其出叶期及雄蕊与花被片的位置关系等形态指标^[3]。细胞学方面, 其核型分析从 1931 年开始, 比较有代表性的是刘琰等^[4]的观点, 即根据核型将石蒜属植物划分为两大类, 由于本属植物极易发生天然杂交, 细胞学方法得到的核型变异比较大^[5]。在分子标记方面, 虽然从 2002 年开始陆续报道^[6-12], 但仍然有许多问题有待解决。本实验用扩增片段长度多态性 (AFLP) 分子标记对石蒜属植物 20 份材料 (含 13 个种 2 个变

收稿日期: 2010-03-17

基金项目: 河南省杰出青年基金项目 (094100510018); 河南省教育厅自然科学研究项目 (2007180011)

作者简介: 黄想安 (1978—), 女, 湖北省洪湖市人, 硕士, 研究方向为植物遗传多样性研究。Tel: (0378)5218979 E-mail: hxa_0215@163.com

*通讯作者 尚富德 Tel: (0378)3886199 E-mail: fudeshang@henu.edu.cn

种)进行DNA指纹图谱分析,探讨本属种质资源的遗传多样性和种间亲缘关系,为今后育种、科研提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 植物材料及其来源

20份供试材料(含13个种2个变种)分别采自江苏南京、浙江杭州、浙江临安、河南信阳、河南洛阳等地。材料由南京中山植物园李永荣和河南大学董美芳鉴定,标本存放于河南大学植物标本室,其种名、来源见表1。每份材料各取10株以上植株的叶片,经混合后用硅胶干燥,于-70℃冰箱保存备用。

1.2 AFLP的实验步骤

1.2.1 DNA的提取 每种材料称取0.5g叶片,采用改良的CTAB法^[14-15]提取DNA。用3×CTAB法^[16-17]获得了高质量的石蒜属植物基因组DNA模板,DNA纯度和量分别用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 酶切 用限制性内切酶 *EcoRI*/*MseI* 进行双酶切,37℃、3h,65℃、2.5h。

1.2.3 接头连接 每个酶切体系中加入20μL连接反应体系,25℃、2h。

1.2.4 预扩增 *EcoR* I 引物序列为E-A: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3', *MseI* 引物序列为M-C: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'。预扩增程序为:94℃、3min;94℃、30s,56℃、30s,72℃、80s,共26个循环;72℃、5min;4℃保存。

1.2.5 选择性扩增 选扩引物是在预扩引物基础上随机增加3个核苷酸,选择性扩增程序为:94℃、

3min;94℃、30s,65℃、30s,72℃、80s,共13个循环,其中退火温度每循环下降0.7℃;94℃、30s,56℃、30s,72℃、80s,共23个循环;72℃、5min;4℃保存。

1.2.6 变性 选择性扩增产物中加入2/3体积的变性Buffer,94℃、4min,0℃、5min,-20℃储存备用。

1.2.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳 变性后产物用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,分预电泳和正式电泳两步。

1.2.8 银染 程序参照Bassam等^[15]和韩远记等^[18]的方法。

1.2.9 带型统计 用“1”和“0”进行带型统计,对扩增产生信号较强的、重复性较好的带记为“1”,而同一位置上扩增产生信号较弱、重复性较差的带或者未出现带的记为“0”。利用NTSYS-pc2.10e软件对统计结果进行分析,计算相似系数(GS),并按照非加权算术平均数聚类方法(UPGMA)构建系统聚类分析树状图。

2 结果

2.1 扩增片段长度的多态性结果

利用AFLP技术对20份供试材料的种间亲缘关系进行了研究。从33对选择性扩增引物中筛选出6对引物。共扩增得到330条清晰可统计的条带,其中多态性条带320条,平均每对引物产生55条带,多态性比率为96.8%(表2)。以E-ACC/M-CAT引物组合产生的带最多,为70条,多态性带为68,多态性比率为97.1%(图1);E-AAC/M-CAT引物组合产生的带最少,为43条,其多态性比率为95.3%。

表1 用于AFLP分析的20份石蒜属植物材料

Table 1 Twenty materials of *Lycoris* Herb. used for AFLP analysis

序号	种	采集地	标本	序号	种	采集地	标本
1	石蒜 <i>Lycoris radiata</i>	江苏南京	JS882501	11	红蓝石蒜 <i>L. haywardii</i>	江苏南京	JS882511
2	忽地笑 <i>L. aurea</i>	江苏南京	JS882502	12	江苏石蒜 <i>L. houchyshelii</i>	浙江杭州	ZJ881802
3	中国石蒜 <i>L. chinensis</i>	江苏南京	JS882503	13	鹿葱 <i>L. squamigera</i>	江苏南京	JS933001
4	长筒石蒜 <i>L. longituba</i>	江苏南京	JS882504	14	玫瑰石蒜 <i>L. rosea</i>	江苏南京	JS933002
5	换锦花 <i>L. sprengeri</i>	江苏南京	JS882505	15	中国石蒜 <i>L. chinensis</i>	河南信阳	HN841501
6	黄长筒石蒜 <i>L. longituba</i> var. <i>flava</i>	江苏南京	JS882506	16	中国石蒜 <i>L. chinensis</i>	浙江杭州	ZJ933101
7	陕西石蒜 <i>L. shaanxiensis</i>	江苏南京	JS882507	17	稻草石蒜 <i>L. straminea</i>	江苏南京	JS882509
8	安徽石蒜 <i>L. anhuiensis</i>	江苏南京	JS882508	18	江苏石蒜 <i>L. houchyshelii</i>	江苏南京	JS882512
9	稻草石蒜 <i>L. straminea</i>	浙江杭州	ZJ881801	19	忽地笑 2	河南信阳	HN841502
10	香石蒜 <i>L. incarnatais</i>	江苏南京	JS882510	20	石蒜 <i>L. radiata</i> var. <i>radiata</i>	河南洛阳	HN841501

表 2 AFLP 选择性扩增引物和扩增结果

Table 2 AFLP primer combinations and amplification

引物对	可统计带	多态性带	多态性比率/%
E-ACC/M-CAT	70	68	97.1
E-ACA/M-CTA	43	41	95.3
E-AAC/M-CAT	43	41	95.3
E-ACA/M-CTT	59	57	96.6
E-ACG/M-CTT	58	57	98.3
E-AAG/M-CAT	57	56	98.2
总计	330	320	
平均	55	53	96.8

在 AFLP 技术得到的 DNA 指纹图谱中, 石蒜属不同的种 (变种) 都有其特异性条带, 其遗传差异性特别明显, 表明石蒜属具有非常高的种间遗传多样性。AFLP 标记用于检测石蒜属遗传多样性的效率很高, 为石蒜物种的分类鉴定提供了一个很有效的依据。

2.2 遗传相似性结果

以 AFLP 图谱上 DNA 条带的统计为依据, 用 UPGMA 聚类法对供试的 20 份材料进行聚类, 得到一树状分支图 (图 2)。20 份材料间的遗传相似系数 (GS) 在 0.38~0.89。南京的忽地笑 1 和中国石蒜 1 之间的 GS 最大 (0.89), 表明两个种之间的亲缘关系最近, 此结果与邓传良等^[3]的结果一致, 符合形态学和细胞学结论。

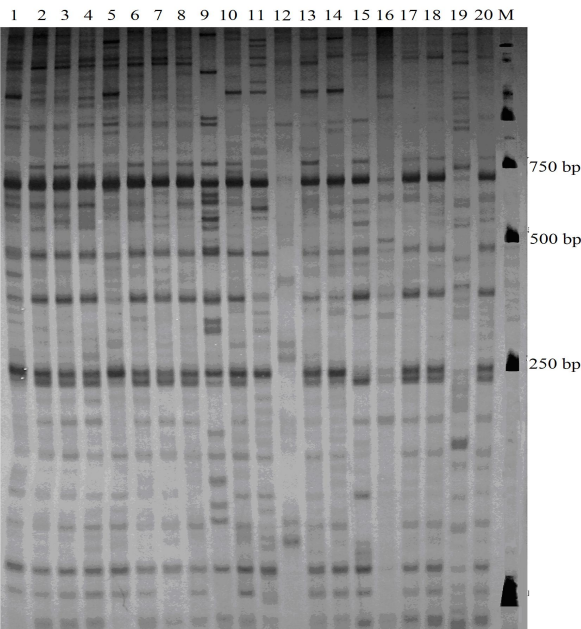


图 1 20 份石蒜属材料的 AFLP 电泳图谱

Fig. 1 AFLPs electrophoresis of 20 materials of *Lycoris* Herb.

GS 为 0.59 时, 20 份石蒜属材料被分为 3 个类群: 第一类为主要类群; GS 为 0.70 时此类群被划分为 5 个亚类群: I 亚类群包含石蒜 1、忽地笑 1、中国石蒜 1、长筒石蒜、黄长筒石蒜、陕西石蒜和换锦花。这一亚类群材料采集地都是江苏南京, 且

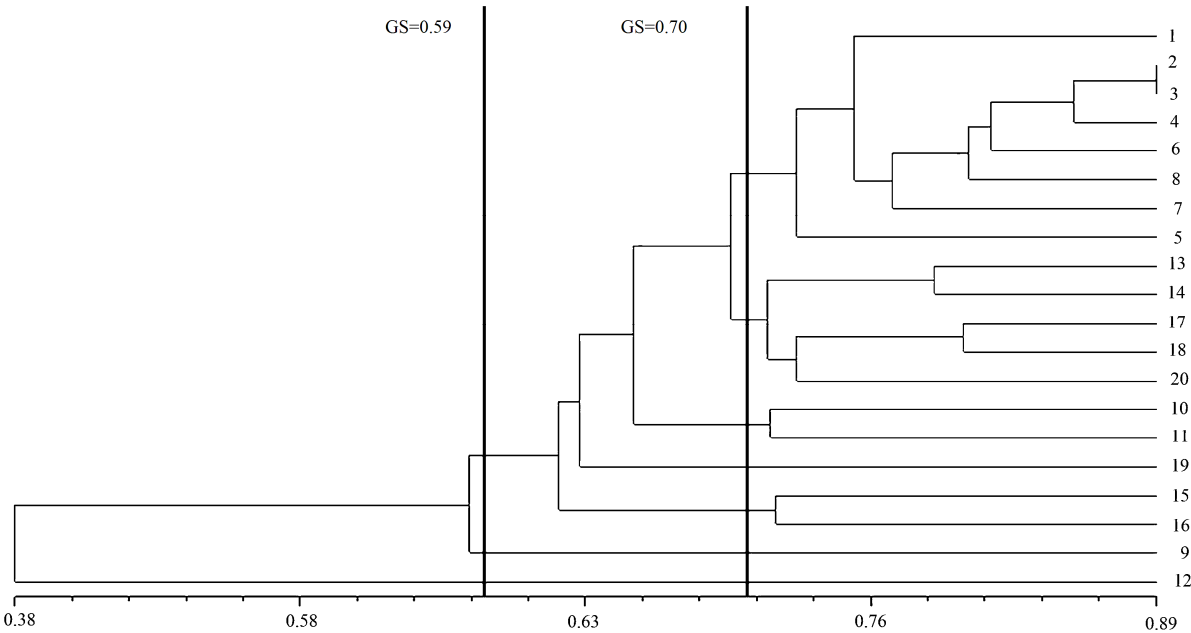


图 2 20 份石蒜属材料的 AFLP 分子标记聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 20 materials of *Lycoris* Herb. based on AFLP markers generated by UPGMA

均为 2 倍均体物种, 花色大都是黄色 (长筒石蒜、石蒜 1 和换锦花除外)。II 亚类群包括南京的鹿葱、夏水仙、玫瑰石蒜、稻草石蒜 2、江苏石蒜 2 以及河南洛阳的石蒜 (3x)。此亚类群在形态上均为花葶较矮、秋出叶类型 (夏水仙为春秋两季出叶类型), 染色体为 3 倍体或非整倍体, 这一结果与李淑顺等^[18]的结果一致。III 亚类群由江苏南京的香石蒜和红蓝石蒜聚合在一起, 这两个种被认为是杂交种。IV 亚类群由河南信阳鸡公山的忽地笑 2 单独聚为一类。V 亚类群由河南信阳的中国石蒜 2 和浙江杭州的中国石蒜 3 聚为一类。

第二类群为浙江临安的稻草石蒜 1; 第三类群为浙江杭州的江苏石蒜 1。这两个类群的出现表明了石蒜属不仅存在较大种间遗传多样性, 而且也存在较大的种内遗传多样性。

以上结果表明了 AFLP 分子标记用于石蒜属种间和种内分类的高效性, AFLP 分子标记能有效区别不同采集地的材料, 即同一地理源的材料间亲缘关系较近。真实地反映石蒜属植物种间的亲缘关系, 体现出良好的重现性、稳定性。

3 讨论

3.1 AFLP 体系中的技术要点

目前, AFLP 分子标记已经广泛应用于多种植物的遗传育种和系统学分类的研究, 与同工酶分子标记、ISSR-PCR 分子标记、随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术相比, 被认为是一种比较稳定、高效的分子标记技术^[20-21]。但是它的过程繁多, 涉及到酶切、连接、预扩增、选择性扩增、银染等许多步骤, 因此有很多因素影响 AFLP 分析结果, 如模板 DNA 的纯度, 酶切条件的优化, 两步 PCR 扩增的温度参数, 银染技术等都是影响 AFLP 结果真实性的直接原因。

选择性扩增产物的银染是显现序列信息的一种新方法, 银染技术不需要特殊的实验设备和防护措施, 且耗时短, 仅 2.5 h 就可完成电泳到最后的银染结果, 极大地缩短了实验周期。与同位素方法相比, 既节省时间, 又降低了实验成本, 还减少了环境污染及对人体的危害。银染的成败受水、洗涤等因素的影响。

3.2 石蒜属遗传相似性

由聚类图可知, 所有江苏南京的 14 份材料 (含 13 种 1 变种) 在 GS 为 0.68 时全部聚在一起 (河南洛阳的石蒜 2 除外), 其次是河南的 2 个种, 最后是

浙江的 3 个种, 浙江的材料与其他材料的亲缘关系较远。由此可见, 石蒜属植物地源性差异比较显著。其中江苏石蒜属资源的遗传变异程度相对较低, 有着较高的遗传相似性, 亲缘关系相对较近。江苏南京的材料中第 I 亚类, 中国石蒜和忽地笑的 GS 为 0.89, 此结果与邓传良^[3]等的形态研究结果一致, 这两个种无论花色还是花形均相似, 染色体核型公式也相同 ($2n=16$); 安徽石蒜, 黄长筒石蒜与长筒石蒜间相似性较高, 支持袁菊红^[22]2007 年分类结果; 此亚类中大部分材料花色以黄色为主, 核型以 $2n=16$ 居多。第 II 亚类在相似系数为 0.71 时聚在一起, 得到形态学和细胞学的支持, 此亚类分类结果与李淑顺等^[19]、张露等^[7]和邓传良等^[4]的结论相一致。第 III 亚类由香石蒜和红蓝石蒜聚为一类, 形态上二者的花色均为双色, 且均疑为杂交种。第 IV 亚类为河南信阳的忽地笑 2 单独聚类, 表明河南的忽地笑与其他种的亲缘关系相对较远。第 V 亚类中南京采的中国石蒜 2 和河南鸡公山的中国石蒜 3 聚在一起。

3.3 石蒜属遗传多样性

由图 2 可以看到本属植物无论种间还是种内遗传多样性都很丰富, 某些种的变异非常大, 如江苏石蒜, 表明本属植物出现了较大的遗传分化。造成这种现象的原因可能为: (1) 地理隔离是植物种群间基因交流的一道天然屏障, 削弱了两地之间植物种群基因交流, 从而导致种内出现较明显分化^[23], 如浙江的中国石蒜 2 和河南鸡公山的中国石蒜 3 聚在一起, 但没有和南京的中国石蒜 1 聚在一起; (2) 浙江的江苏石蒜 1 与其他石蒜属材料的亲缘关系最远, 或许是因为江浙地区的石蒜属植物自然资源丰富、种类繁多, 种群之间发生了基因交流; (3) 南京的石蒜 1 也没有和河南的石蒜 2 (3x) 聚在一起, 可能由于一个是 2 倍体, 一个是 3 倍体, 倍性的不一致导致这两个材料没聚在一起。石蒜是本属植物中多样性最高种, 具有丰富的遗传多样性, 是本属的代表种, 不仅在形态上有较大变异如叶片宽窄, 鳞茎大小及花瓣退化等, 而且在细胞学上变异如多倍化现象也较多。石蒜的遗传多样性以及石蒜属的遗传多样性对本属植物的科研和生产应用都有很大促进作用。

3.4 展望及意义

本研究对本属不同地方物种进行亲缘关系分析, 结合形态指标分析, 在实际应用中可以指导亲

本选配,根据不同的育种目标,选择亲缘关系较远的材料,增加后代的遗传和变异,选育出杂种优势更强,综合性状更好的石蒜属新种或新品种。仅石蒜在形态、生长发育习性、生理生化特性以及分子水平等方面就具有丰富的遗传多样性^[24],目前选育的“浙石蒜 1 号”新品种,是一种药用价值较高的品种^[25]。另外,应加强对花形优美,叶绿期较长的植物的选育工作,以丰富石蒜属植物园林景观中的应用。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第十六卷. 第一分册. 北京: 科学出版社, 1985.
- [2] 金雅琴, 黄雪芳, 李冬林. 江苏石蒜的种质资源及园林用途 [J]. 南京农专学报, 2003, 19(3): 17-21.
- [3] 季春峰. 石蒜属资源开发与利用 [J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(6): 14
- [4] 邓传良, 周 坚. 石蒜属植物分支系统学分析 [J]. 植物研究, 2005(4), 10: 393-399.
- [5] 刘 琰, 徐炳声. 石蒜属的核型研究 [J]. 植物分类学报, 1989, 27(4): 257-264.
- [6] 秦卫华. 中国石蒜属植物系统学研究 [D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2004.
- [7] 张 露, 蔡友铭, 诸葛强, 等. 石蒜属种间亲缘关系 RAPD 分析 [J]. 遗传学报, 2002, 29 (10): 915-921.
- [8] 崔永兰, 黄敏仁, 王明麻. 忽地笑 (*Lycoris aurea*) 叶片 cDNA 文库的构建与分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(3): 86-88.
- [9] 邓传良, 周 坚, 卢龙斗, 等. 长筒石蒜种质资源的 RAPD 及 ISSR 研究 [J]. 云南植物研究, 2006, 28 (3): 300-304.
- [10] Shi S D, Qiu Y X, Wu L, *et al.* Interspecific relationships of *Lycoris* (Amaryllidaceae) inferred from inter-simple sequence repeat data [J]. *Sci Horti*, 2006, 110: 285-291.
- [11] Shi S D, Qiu Y X, Li E X, *et al.* Phylogenetic relationships and possible hybrid origin of *Lycoris* species (Amaryllidaceae) revealed by ITS sequences [J]. *Biochem Gene*, 2006, 44: 198-203.
- [12] 吴 铃, 卢毅军, 史树德, 等. 中国石蒜属种间亲缘关系 ITS 序列分析 [J]. 亚热带植物科学, 2007, 36 (1): 31-35.
- [13] 谢 峻, 谈 锋, 冯 巍, 等. 石蒜属植物分类鉴别药用成分及生物技术应用研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1902-1905.
- [14] Ude G, Pillay M, Nwakanma D, *et al.* Analysis of genetic diversity and sectional relationships in *Musa* using AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 1239-1245.
- [15] Bassam B J, Caetano-Anollés G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining DNA in polyacrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1991, 196: 80-83.
- [16] 阎学燕, 肖保林, 韩远记, 等. 湖北 25 个桂花栽培品种的 AFLP 分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32(增刊): 16-20.
- [17] Yan X Y, Xiao B L, Han Y J, *et al.* AFLP analysis of genetic relationships and diversity of some Chinese *Osmanthus fragrans* cultivars [J]. *Life Sci*, 2009, 6 (2): 11-16.
- [18] 韩远记, 董美芳, 袁王俊, 等. 部分桂花栽培品种的 AFLP 分析 [J]. 园艺学报, 2008, 35 (1): 137-142.
- [19] 李淑顺, 赵九洲, 袁 娥. 几种石蒜属花卉观赏性状的灰色评价 [J]. 徐州师范大学学报: 自然科学版, 2004, 22(1): 69-72.
- [20] Powell W, Morgante M, Ander C. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. *Mol Breed*, 1996, (2): 225-238.
- [21] Russell J R, Fuller J D, Macaula Y M. Direct comparison of levels of genetic variation among barely accessions detected by RFLPs, SSRs and RAPDs [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 714-712.
- [22] 袁菊红, 彭 峰, 冯 煦, 等. 应用 HPLC 图谱进行石蒜属种间关系和分类研究 [J]. 植物学报, 2007, 27(11): 2195-2201.
- [23] 袁菊红, 孙 视, 彭 峰, 等. 石蒜属植物遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 标记比较研究 [J]. 中草药, 2007, 38(10): 1555-1561.
- [24] 袁菊红, 胡绵好, 张明霞, 等. 石蒜种质资源的数量分类 [J]. 浙江林学院学报, 2009, 26 (5): 633-638.
- [25] 徐建中, 王志安, 孙乙铭, 等. “浙石蒜 1 号”新品种选育 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (19): 1-3.