

·快讯 Short Communication·

葱属系统发育的 PCR-RFLP 分析初报*

¹何兴金 ²葛 颂 ¹许介眉 ²洪德元

¹(四川联合大学生物系 成都 610064)

²(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室 北京 100093)

关键词 葱属,分子系统发育, RFLP, *trnK* 基因, *rpL16* 基因

PCR-RFLP ANALYSIS ON PHYLOGENY OF *ALLIUM**

¹HE Xing-Jin ²GE Song ¹XU Jie-Mei ²HONG De-Yuan

(Biology Department, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

(Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract The molecular phylogeny of the genus *Allium* which includes eighteen species selected from nine sections was investigated through PCR-RFLP analysis of two chloroplast DNA fragments, including *trnK* gene (approximately 2 520 bp) and *rpL16* gene (approximately 1 230 bp). Digestion of these two fragments by 26 restriction endonucleases yielded 303 polymorphic recognition sites, of which 163 were informative sites. The restriction site data matrix were analyzed following the parsimonious Wagner and parsimonious Dollo principle of PAUP (version 3.1.1). Topologically, the most parsimonious Wagner tree constructed by branch-and-bound and heuristic search was similar to the most parsimonious Dollo tree. All the taxa of *Allium* form a monophyletic group, and five sections based on morphological characters were supported strongly by this result. Sect. *Auguinum* is closely related to Sect. *Bromatorrhiza*, Sect. *Molium* is closely related to Sect. *Caloscordum*. Their reliability was farther confirmed by the bootstrap test very well. In morphology, *A. pallasii* is closely related to *A. caeruleum* and belongs to Sect. *Haplostemen*, *A. cepa* is closely related to *A. galanthum* and belongs to Sect. *Cepa*. But evidence from cladistics of parsimonious tree based on 163 informative sites of PCR-RFLPs showed that they are neither confined to a monophyletic group nor to a natural taxon.

Key words *Allium*, Molecular phylogeny, RFLP, *trnK* gene, *rpL16* gene

葱属 (*Allium*) 为广义百合科 (Liliaceae) 葱族 (Allieae) 的一个重要类群。该属种类丰富、分布极广, 关于它的系统发育和进化问题, 目前尚存在不少分歧^[1]。我国有葱属 110 种 (含变种和引进外来种), 主要分布于东北、华北、西北和西南地区。我们在综合形态分类和细胞分类的基础上, 从产于我国的 9 个组中, 每组选择 1~2 个代表种, 用 PCR 方法, 扩增出 2 520 bp 的 *trnK* (tRNA-Lys) 基因和 1 230 bp 的 *rpL16* (ribosomal protein L16) 基因。*trnK* 基因和 *rpL16* 基因均为叶绿体基因 (cpDNA), *trnK* 基因是叶绿体中 tRNA 基因, 代表携带 Lys 的 tRNA 基因, 同时在 *trnK* 的内显子中, 还含有一个 *orfK* (open reading frame) 基因, 又称 *matK* (maturase) 基因, 长 1 626 bp, 编码一种成熟酶。该成熟酶参与 RNA 转录体中 II 型内含子的剪切; *rpL16* 基因编码核蛋白体大亚基多肽 L16。在高等植物中, 叶绿体基因组相对比较保守, 并且不像线粒体基因组那样发生频繁的重排事件, 也不像核基因组那样有较多的重复序列, 所以被广泛用于分子系统学

* 国家自然科学基金 (39670053) 和中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室资助项目。Supported by the National Natural Science Foundation of China (39670053) and Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences.

收稿日期: 1998-05-05 接受日期: 1998-07-16

研究中。本文所选的两个 cpDNA 基因中, *trnK* 基因内的 *matK* 基因是叶绿体基因组蛋白编码基因中进化速率最快的基因之一, 具有重要的系统学价值^[3]。将 PCR 扩增的两个 cpDNA 基因用 26 种限制性内切酶对其 DNA 片段进行酶切分析, 旨在从分子水平对葱属植物的系统发育进行探讨。

1 材料和方法

研究类群代表国产全部 9 组 18 种葱属植物, 这 18 个种的名称及隶属的组详见图 2 及其注解。另外, 选取百合属 (*Lilium*) 和知母属 (*Anemarrhena*) 各 1 种为外类群。试材为用硅胶干燥的鲜叶。总 DNA 提取采用 CTAB 法^[2] 并做改进。PCR 扩增反应是在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上进行, 反应体积为 50 μ L, 内含 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.3), 0.25 g/L BSA, 2 mmol/L MgCl₂, 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶 (购自北京农业大学), dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 200 μ mol/L, 40~50 ng 总 DNA, 引物 P₁ 和引物 P₂ 各 10 pmol。 *rpL16* 基因的引物是根据紫萼属 *Spirodela oligorhiza* 的 *rpL16* 基因设计的^[4], 引物 P₁ 的序列为 5'-GCTATGCTTAGT-GTGTGACT-3', 位于 *S. oligorhiza* *rpL16* 基因的 71~90 bp, 引物 P₂ 为 5'-GCTACCCATATTTTTCCACC-3', 位于 1641~1661 bp 位上, 片段长度为 1251 bp。我们以这对引物从葱属植物中扩增出了一个长约为 1230 bp 的片段。扩增程序为: 70 $^{\circ}$ C, 4 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 53 $^{\circ}$ C, 25 s; 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 两个循环 \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 20 s; 53 $^{\circ}$ C, 20 s; 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 38 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 6 min。 *trnK* 基因的引物是按照水稻的 cpDNA 序列设计, 位于水稻的 cpDNA 序列的 1413~3972 bp 之间, 其长度为 2520 bp; 引物 P₁ 的序列为 5'-AACCCGGGAAAC-TAGTCGGATG-3', 引物 P₂ 的序列为 5'-GGTTGCTAACTCAATGGTAG-3', 以这对引物, 我们从葱属中扩增出了 2520 bp 的 *trnK* 基因片段。扩增程序为: 70 $^{\circ}$ C, 4 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 55 $^{\circ}$ C, 20 s; 72 $^{\circ}$ C, 150 s; 三个循环 \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 20 s; 55 $^{\circ}$ C, 20 s; 72 $^{\circ}$ C, 150 s; 38 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 6 min \rightarrow 25 $^{\circ}$ C, 90 s。扩增产物选用 *Ava* II、*Bam*H I、*Bsp*H I、*Bst*B I、*Bst*N I、*Cla* I、*Dde* I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Fok* I、*Hind* III、*Hha* II、*Hinf* I、*Hpa* II、*Kpn* I、*Nru* I、*Pst* I、*Rsa* I、*Sau*3A I、*Sca* I、*Sma* I、*Ssp* I、*Sst* I、*Taq* I、*Xba* I、*Xho* I 等 26 种限制性内切酶, 对这两个基因进行酶切, 酶解反应体积为 20 μ L, 内含 5~8 μ L PCR 产物, 2~3 U 限制性内切酶和 1 \times 内切酶反应缓冲液。酶解反应时间为 2~2.5 h。酶解产物在 1.5%~2.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液为 1 \times TBE。电泳结束直接在 FOTODYNE 型透射紫外灯上拍照。

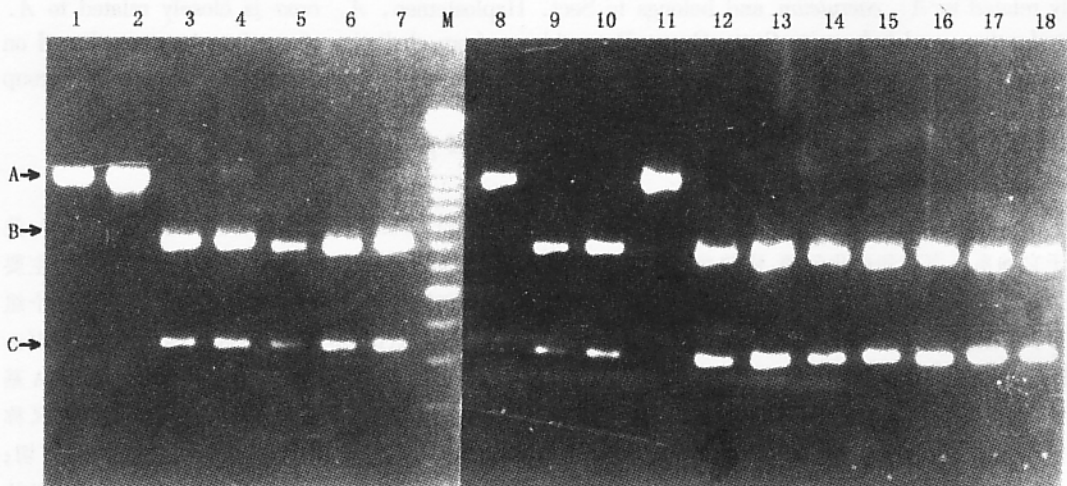


图 1 *Bam*H I 对葱属植物 *rpL16* 基因片段酶切分析

Fig. 1 *Bam*H I digested the PCR-amplified chloroplast gene *rpL16* in the *Allium*

A. 1230 bp; B. 790 bp; C. 440 bp; M. 100 bp DNA ladder; 1. *Allium victorialis*; 2. *A. prattii*; 3. *A. hookeri*; 4. *A. fasciculatum*; 5. *A. platyspathum*; 6. *A. sikkimense*; 7. *A. fistulosum*; 8. *Anemarrhena asphodeloides*; 9. *A. altaicum*; 10. *A. galanthum*; 11. *Lilium sargentiae*; 12. *A. cepa*; 13. *A. pallasii*; 14. *A. caeruleum*; 15. *A. porrum*; 16. *A. sativum*; 17. *A. tubiflorum*; 18. *A. robustum*.

根据限制性内切酶位点的有无得到 1(位点存在)、0(位点不存在)数据矩阵,然后用 PAUP 3.1.1 软件^[5]分别采用 Wagner 简约法和 Dollo 简约法进行 branch-and-bound 和 heuristic 搜索,为进一步判断 Wagner 简约树和 Dollo 简约树中各分支的可信度,采用 bootstrap 分析方法检验。

2 结果和讨论

PCR 扩增反应的结果,扩增出葱属植物的 *rpL16* 基因片段长度为 1 230 bp,扩增出的 *trnK* 基因片段长度为 2 520 bp,分别用上述的 26 种酶进行酶切,结果 *rpL16* 基因仅有 15 种酶有酶切变异位点,它们是 *Bam*H I (图 1)、*Bst*N I、*Dde* I、*Eco*R I、*Fok* I、*Hha* I、*Hinf* I、*Hpa* II、*Nru* I、*Rsa* I、*Sau*3A I、*Ssp* I、*Sst* I、*Taq* I、*Xba* I。*trnK* 基因有 18 种酶有酶切变异位点,它们是 *Bam*H I、*Bsp*H I、*Bst*B I、*Bst*N I、*Cla* I、*Dde* I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Fok* I、*Hha* I、*Hinf* I、*Hpa* II、*Kpn* I、*Rsa* I、*Sau*3A I、*Ssp* I、*Sst* I、*Taq* I。两个基因酶切结果,共得到 303 个酶切变异位点,163 个信息位点。数据矩

阵运用连续加权法(successive weighting)后,用 branch-and-bound 方法分析得到一个最简约树,而用 heuristic 方法得到 3 个 Wagner 简约树,但其严格一致树的分支与 branch-and-bound 的结果一样。运用 bootstrap 检验法对数据进行 1 000 次重抽样分析,其结果强烈支持各个分支。数据矩阵运用连续加权法处理后,采用 Dollo 简约原则,运用 branch-and-bound 和 heuristic 方法分析,均得到一个简约树(图 2),且完全一致。结果表明葱属为一个单系群,用 bootstrap 方法对数据进行 1 000 次重抽样分析,其结果也强烈支持这一结果。

《中国植物志》^[6]将我国葱属植物分为 9 个组。宽苞韭与高山韭(根茎组,图 2 中 I)、洋葱与实葶葱(洋葱组,图 2 中 V)、葱与阿尔泰葱(葱组,图 2 中 IV)因根茎的形态和有无,叶形以及花丝全缘否,小苞片的有无,分别放于 3 个不同的组中。但 2 个基因片段的分析表明,这几个种是一个具有较紧密亲缘关系的单系群。宽苞葱与洋葱、高山韭与棱叶韭近缘,而实葶葱与葱组有较近的亲缘。特别值得一提的是棱叶韭与小山蒜 2 个种,它们在形态分类学中因鳞茎单生、叶圆柱或棱柱状等形态特征被放于单生组(图 2 中 VI)中,但在本研究的分支分析图中却被远远地分开,棱叶韭与高山韭近缘,而小山蒜却与葱属所有的类群形成一个并系群(图 2)。造成棱叶韭与小山蒜在形态上相似而分子水平上差异明显的原因是形态上趋同演化还是 cpDNA 基因发生了变异尚有待进一步的研究。合被韭与健韭这两个类群因花被片基部是否合生而被放于合被组(Sect. Caloscordum)和多籽组(Sect. Molium)中,但本研究表明,这 2 个类群为一具紧密亲缘关系的单系群,进一步的形态学分析同样支持这一结果,因这 2 个类群每个子房室

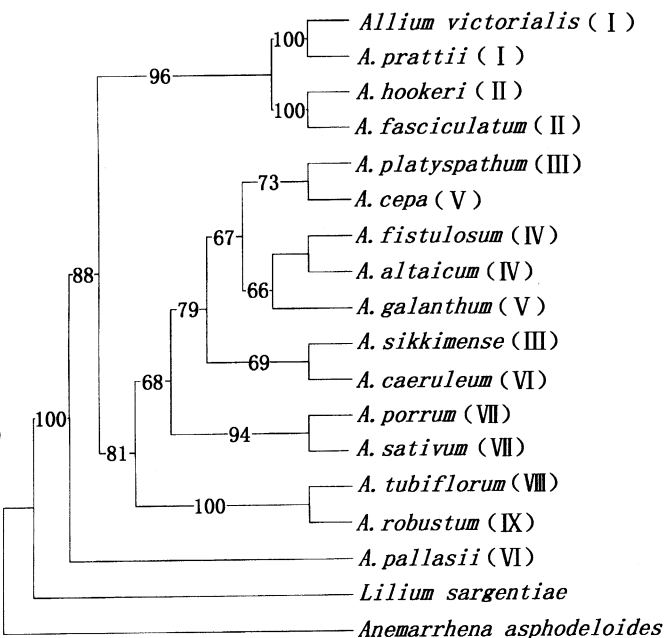


图 2 基于 *rpL16* 和 *trnK* 基因片段的 PCR-RFLP 分析所构建的
大于 50% 原则的 Dollo 简约性一致树

Fig. 2 50% majority-rule consensus Dollo parsimonious tree of *Allium* constructed from 163 informative sites of digested *rpL16* and *trnK* gene. The tree length = 179 819 (use reweigh method weight = 1 000), with CI = 0.705 and RI = 0.851. Bootstrap (1 000 replicates) values are indicated on the branches. Nine sections are as follows. I. Sect. Anguinum; II. Sect. Bromatorrhiza; III. Sect. Rhizirideum; IV. Sect. Schoenoprasum; V. Sect. Cepa; VI. Sect. Haplostemon; VII. Sect. Allium; VIII. Sect. Caloscordum; IX. Sect. Molium.

中均有 4 个以上胚珠,这说明每子房室中的胚珠数多于 4 个这一特征是这两个植物类群的共有衍征,而花被合生这一特征则是合被韭的自征。

本文的 PCR-RFLP 分析结果还表明,葱属植物可以分为 5 个高于组一级的分类阶元。根茎组(图 2 中 III)的 2 个类群被分在了一个大的分支的两端,不是一个单系群,说明该组的划分是不自然的。单生组(图 2 中 VI)的 2 个类群被分在了两个不同的较高级的分支中,因而也不是一个单系群,表明棱叶韭与小山蒜在形态上的相似很可能是趋同演化的结果,故单生组的建立是不自然的。分子水平的分支分析结果得到了 bootstrap 检验的强烈支持(支持系数见图 2)。关于国产葱属的分子系统学研究,我们已将研究类群扩大到 47 个种(含 5 个外类群),其结果亦与上述结果有许多共同点(将另文详细讨论)。

参 考 文 献

- 1 Linne von Berg G, Samoylov A, Klaas M, Hanelt P. Chloroplast DNA restriction analysis and the infrageneric grouping of *Allium* (Alliaceae). *Plant Syst Evol*, 1996, **200**:253 ~ 261
- 2 Doyle J, Doyle J L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem Bull*, 1987, **19**:11 ~ 15
- 3 Johnson L A, Soltis D E. Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* sequences. *Ann Missouri Bot Gard*, 1995, **82**:149 ~ 175
- 4 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). *Amer J Bot*, 1996, **83**:430 ~ 439
- 5 Swofford D L. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. computer software. Illinois Natural History Survey: Champaign, Illinois, 1993.
- 6 Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae(中国科学院中国植物志编辑委员会) ed. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Tomus 14. Beijing: Science Press, 1980. (in Chinese)