

中国石蒜属种间关系的 $trnH-psbA$ 序列分析

全妙华^{1,2,3,*}, 欧立军^{1,2,3}, 余朝文^{1,2,3}, 陈东明^{1,2,3}, 叶 威¹

(¹怀化学院生命科学系, 湖南怀化 418008; ²民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南怀化 418008; ³湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南怀化 418008)

摘 要: 利用叶绿体基因 $trnH-psbA$ 序列对石蒜属 16 种 (含 1 变种) 的种间关系进行了分析。结果表明: 所测物种的序列全长在 546 ~ 641 bp, GC 含量为 35.86% ~ 36.41%, 其核苷酸变异位点 14 个, 信息位点 5 个, 这些位点可以区分石蒜属物种; 供试材料聚为 3 类, 除中国石蒜、忽地笑和玫瑰石蒜的系统位置有所不同外, 与经典分类基本一致。叶绿体基因 $trnH-psbA$ 序列可以有效地鉴别石蒜属物种及分类, 是一种有效分子标记。

关键词: 石蒜属; $trnH-psbA$ 序列; 序列变异; 种间关系; 中国

中图分类号: S 682.2⁺9

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 08-1589-06

Analysis of Interspecific Relationships in *Lycoris* Herb. Based on $trnH-psbA$ Sequence

QUAN Miao-hua^{1,2,3,*}, OU Li-jun^{1,2,3}, SHE Chao-wen^{1,2,3}, CHEN Dong-ming^{1,2,3}, and YE Wei¹

(¹Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418008, China; ²Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Huaihua, Hunan 418008, China; ³Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-Western Medicinal Plant and Ethnobotany, Huaihua, Hunan 418008, China)

Abstract: The interspecific relationship of 16 species (including 1 variation) in *Lycoris* was analyzed using $trnH-psbA$ sequences. The results showed that the length of $trnH-psbA$ sequences of the species was 546 - 641 bp, GC content of them was 35.86% - 36.41%. There were 14 variable sites and 5 information sites, which could be used to identify some species of *Lycoris*. The clustering showed that *Lycoris* could be classified into 3 clades. The classification was basically consistent with that of morphology except for *L. chinensis*, *L. rosea* and *L. aurea*. This paper suggested that $trnH-psbA$ could be used as a good molecular marker to identify or classify plants of *Lycoris*.

Key words: *Lycoris*; $trnH-psbA$ sequence; nucleotide variation; interspecific relationship; China

石蒜属 (*Lycoris* Herb.) 是石蒜科 (Amaryllidaceae) 多年生草本植物, 主产于中国和日本, 少数产于缅甸和朝鲜; 全世界约 20 种, 中国约 15 种 2 变种, 主要分布于长江以南, 尤以温暖地区种类较多 (徐垠 等, 1985; 袁菊红 等, 2008)。该属植物不仅是一类观赏价值颇高的球根花卉, 而且其鳞茎含有丰富的加兰他敏、罗可拉敏等 10 余种生物碱, 具有重要的药用价值 (谢峻 等, 2007;

收稿日期: 2010 - 12 - 01; 修回日期: 2011 - 06 - 30

基金项目: 湖南省科技计划重点项目 (2009FJ2008); 怀化学院民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室项目 (SYSXM200906)

* E-mail: hhqmh100@163.com

感谢南京中山植物园和杭州植物园提供石蒜属植物材料。

袁菊红和胡锦涛, 2009)。由于石蒜属植物花叶不相见的特殊生长发育习性, 并且该属植物在自然界或人工培育下存在广泛的天然杂交 (Kurita et al., 1996), 变异类型较多, 从形态学鉴别该属植物难度较大。因此, 对其准确地鉴别是其有效开发利用的重要前提。

近年来, 运用细胞学 (周守标 等, 2005)、ITS (Shi et al., 2006a; 吴玲 等, 2007)、ISSR (Shi et al., 2006b; 袁菊红 等, 2007) 及染色体核型分析等对石蒜属种间亲缘关系、杂交起源及其分类进行了探讨, 如将石蒜属植物染色体主要分为 3 类: ①中部着丝粒染色体 (M); ②端部着丝粒染色体 (T); ③近端部着丝粒染色体 (t) (赵天荣 等, 2008)。但石蒜属植物的系统分类至今在国内外学术界中争议颇多 (Hsu et al., 1994; 张露 等, 2002; 袁菊红 等, 2008), 如基于叶绿体基因 *trnL-F* 序列将石蒜属植物分为 3 类, 但其中稻草石蒜、忽地笑和香石蒜的系统位置与经典分类的矛盾, 染色体数和核型差异明显的忽地笑与石蒜等物种聚在一类等问题有待进一步研究。*trnH-psbA* 片段是进化速率最快的叶绿体间隔区之一, 采用该片段进一步探讨石蒜属植物种间关系及分类尚未见报道。本试验中在测定石蒜属 15 种 1 变种叶绿体 *trnH-psbA* 序列的基础上, 分析比较石蒜属物种间亲缘关系及变异情况, 为石蒜属物种鉴别和种间亲缘关系分析提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料包括石蒜属 15 种 1 变种共 16 份材料, 其染色体数引自相关文献 (张露 等, 2002; 赵天荣 等, 2008), 见表 1。其中石蒜和忽地笑为作者在野外采集物种, 经怀化学院曾汉元教授鉴定, 其它物种分别由南京中山植物园和杭州植物园提供。每个物种采集 3~5 个株系。

表 1 试验材料和来源
Table 1 The origin of the materials used in this study

来源 Source	编号 Number	种名 Species	染色体数 Chromosomes number
湖南沅陵 Yuanling, Hunan	1	石蒜 <i>L. radiata</i>	22t
湖南中方 Zhongfang, Hunan	2	忽地笑 <i>L. aurea</i>	6M + 10T
杭州植物园 Hangzhou Botanical Garden	3	安徽石蒜 <i>L. anhuiensis</i>	6M + 10T
	4	中国石蒜 <i>L. chinensis</i>	6M + 10T
	5	香石蒜 <i>L. incarnata</i>	4M + 3T + 22t + 1m
	6	红蓝石蒜 <i>L. haywardii</i>	22t
	7	换锦花 <i>L. sprengeri</i>	22t
南京中山植物园 Nanjing Botanical Garden Mem Sun Yat-sen	8	稻草石蒜 <i>L. straminea</i>	3M + 5T + 11t
	9	长筒石蒜 <i>L. longituba</i>	6M + 10T
	10	江苏石蒜 <i>L. houdyshelii</i>	3M + 5T + 22t
	11	陕西石蒜 <i>L. shaanxiensis</i>	未见报道 No report
	12	短蕊石蒜 <i>L. caldwellii</i>	6M + 10T + 11t
	13	乳白石蒜 <i>L. albiflora</i>	3M + 5T + 11t
	14	玫瑰石蒜 <i>L. rosea</i>	22t
	15	鹿葱 <i>L. squamigera</i>	6M + 10T + 11t
	16	黄长筒石蒜 <i>L. longituba</i> var. <i>flava</i>	未见报道 No report

1.2 基因组总DNA提取及其检测

选取各样品幼嫩的叶片, 采用改良的 CTAB 法与 PCR 产物纯化试剂盒相结合提取基因组总 DNA, 用 1.0%琼脂糖电泳检测 DNA 的纯度和浓度。

1.3 *trnH-psbA* 目的带的扩增

trnH-psbA 区扩增使用引物 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' 和 5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'。其 PCR 扩增反应体系为 50 μ L。扩增程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min，94 $^{\circ}$ C 变性 45 s，54 $^{\circ}$ C 退火 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，35 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 *trnH-psbA* 目的带的检测及序列测定

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖电泳检测，确定为目的带且无杂带干扰，DNA 的浓度达到测序要求后，PCR 产物送交上海生工生物技术有限公司测序，为保证所测序列的准确性，分别对每一种类的 *trnH-psbA* 序列的正、反链进行双向测序并校准，重复 3 次。所得序列提交 GenBank，得到 GenBank 登录号（表 2）。

1.5 *trnH-psbA* 序列特征及聚类分析

用 DNAMAN 软件进行序列拼接，然后用 Clustal X1.81 软件排序，运用 MEGA 4.0 软件进行序列分析，并用其中的最大简约法（maximum parsimony, MP）构建系统发育树。对分支的可靠性评价使用靴带值（bootstrap, 1 000 次重复）分析，统计序列间的碱基突变位点、信息位点，计算碱基颠换数、转换数的百分率及 GC 含量等。

2 结果与分析

2.1 石蒜属植物叶绿体 *trnH-psbA* 序列特征及分析

石蒜属 15 种 1 变种共 16 份材料的叶绿体 *trnH-psbA* 序列 PCR 产物经琼脂糖电泳后在 500 ~ 700 bp 处出现一目的条带（图 1）。

测序后得到的序列长度范围为 546 ~ 641 bp，两端切平后长度为 626 bp，AT 含量为 63.59% ~ 64.16%，GC 含量为 35.86% ~ 36.41%，远低于 AT 含量；当空位（gap）作为缺失处理时，有变异位点 14 个，其中信息位点 5 个（表 2），分别占总序列的 2.24% 和 0.80%。信息位点分别位于该序列的第 28、41、45、182 和 481 bp 位点处，其中在第 28、45 和 481 bp 位点处分别发生了 T/A、G/T 和 A/T 碱基的颠换，颠换率为 0.48%；在第 41 bp 位点处发生 A/G 碱基的转换，转换率为 0.16%。

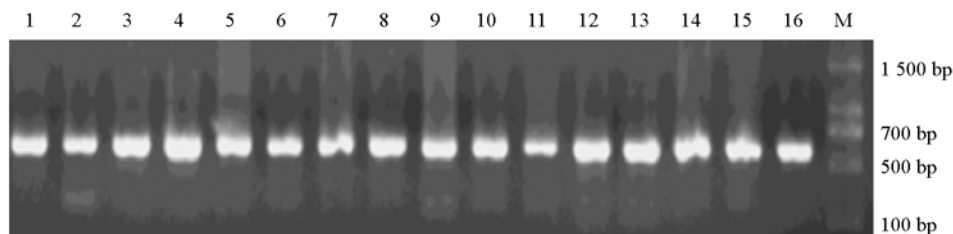


图 1 石蒜属植物 *trnH-psbA* PCR 扩增产物电泳图谱

1 ~ 16 样品名称同表 1；M 为标准 DNA marker。

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR products of *trnH-psbA* in *Lycoris*

1 - 16 material names see Table 1; M: DNA marker.

表 2 石蒜属植物的 *trnH-psbA* 序列特征
Table 2 Sequence characteristics of *trnH-psbA* in *Lycoris*

编号 Number	种名 Species	登录号 GenBank accession number	信息位点 Information site					GC 含量/% GC content
			28	41	45	182	481	
1	石蒜 <i>L. radiata</i>	HM 748828	A	A	T	-	A	36.12
2	忽地笑 <i>L. aurea</i>	HM 748822	A	A	T	-	A	36.41
3	安徽石蒜 <i>L. anhuiensis</i>	HM 748823	T	A	G	G	A	36.21
4	中国石蒜 <i>L. chinensis</i>	HM 748827	T	A	G	G	A	36.01
5	香石蒜 <i>L. incarnata</i>	HM 748830	A	A	T	-	A	36.26
6	红蓝石蒜 <i>L. haywardii</i>	HM 748816	A	G	G	A	T	35.86
7	换锦花 <i>L. sprengeri</i>	HM 748815	A	G	G	G	T	36.21
8	稻草石蒜 <i>L. straminea</i>	HM 748826	T	A	G	G	A	36.15
9	长筒石蒜 <i>L. longituba</i>	HM 748817	T	A	G	G	A	35.88
10	江苏石蒜 <i>L. houdyshelii</i>	HM 748819	T	A	G	G	A	36.01
11	陕西石蒜 <i>L. shaanxiensis</i>	HM 748818	T	A	G	G	A	36.01
12	短蕊石蒜 <i>L. caldwellii</i>	HM 748824	T	A	G	G	A	36.05
13	乳白石蒜 <i>L. albiflora</i>	HM 748820	T	A	G	G	A	36.01
14	玫瑰石蒜 <i>L. rosea</i>	HM 748825	A	A	T	-	A	36.41
15	鹿葱 <i>L. squamigera</i>	HM 748829	T	A	G	G	A	36.05
16	黄长筒石蒜 <i>L. longituba</i> var. <i>flava</i>	HM 748821	T	A	G	G	A	36.19

注：“-”表示碱基缺失。
Note: “-” . Absence.

2.2 基于*trnH-psbA*序列的石蒜属植物聚类分析

如图 2 所示，石蒜属物种聚成 3 类，第 I 类为换锦花、红蓝石蒜和中国石蒜，核型主要为近端部着丝粒染色体 (t)；第 II 类为长筒石蒜、陕西石蒜、江苏石蒜、乳白石蒜、黄长筒石蒜、安徽石蒜、短蕊石蒜、鹿葱和稻草石蒜，核型主要为中部、端部和近端部着丝粒染色体的混合 (M + T + t)；第 III 类为忽地笑、玫瑰石蒜、石蒜和香石蒜，核型主要为近端部着丝粒染色体 (t)，各类均获得了较高的支持率 (有的自展百分比高达 100%)。

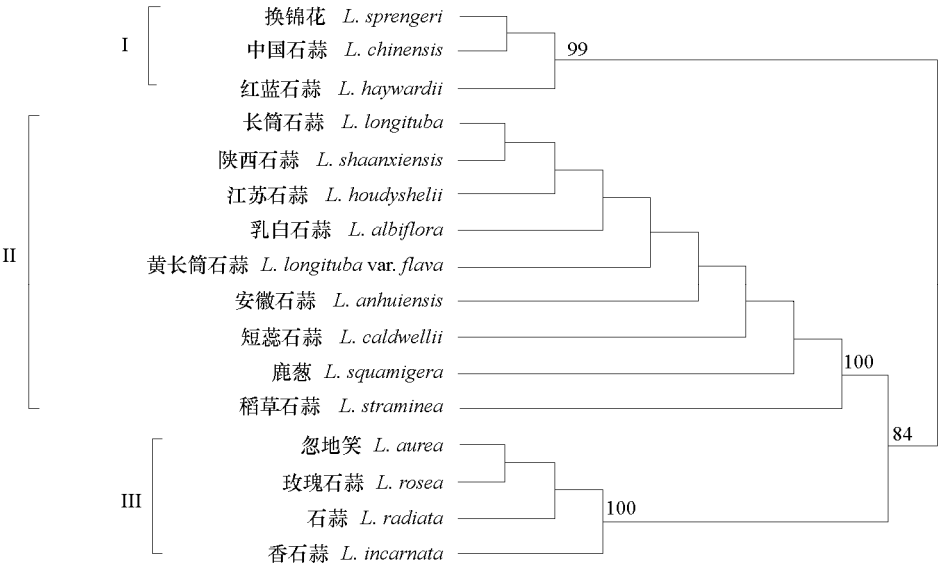


图 2 石蒜属植物 *trnH-psbA* 序列的聚类结果
图中数字表示抽样检验的自展百分比。

Fig. 2 Clustering of *Lycoris* based on *trnH-psbA* sequences
The numbers in the figure indicate percentage of sampling inspection.

3 讨论

3.1 *trnH-psbA* 序列在石蒜属物种鉴别中的意义

在石蒜属中经典的分类系统基本上以花的形态、颜色及叶的发生期为主要依据,但是石蒜属植物花叶不遇,种间差异不显著,同时存在种内形态差异较大,并且石蒜属植物在自然与人工栽培状态下极易杂交,常造成种间甚至种内的混淆,这给正确分类带来了很大的困难(邓传良和周坚,2005)。本研究结果表明,石蒜属植物 *trnH-psbA* 序列长度范围为 546~641 bp,其中石蒜、忽地笑、玫瑰石蒜和香石蒜在第 122 至 207 bp 位点共 85 个碱基的片段均缺失,其序列长度为 546~552 bp,该序列特征可以与其它物种明显区分开来;在第 28 bp 位点,忽地笑和中国石蒜的碱基分别为“A”和“T”,发生了 T/A 碱基的颠换,有利于区分外形相似的物种;在第 41 bp 处发生 A/G 碱基的转换,红蓝石蒜和换锦花在该位点为“G”,其它 14 个物种均为“A”,此碱基差异可以为石蒜属物种鉴别提供分子依据。可见,应用叶绿体 *trnH-psbA* 序列变异能较好的进行石蒜属物种鉴别,解决石蒜属植物从形态学等方面鉴别或区分难度较大的问题。

3.2 基于 *trnH-psbA* 序列探讨石蒜属种间亲缘关系及分类

杂交在石蒜属中是一个非常普遍的现象,许多学者认为石蒜属中 $2n = 19$ (如 *L. straminea* 和 *L. albiflora*) 是 $2n = 16$ 和 $2n = 22$ 的二倍体杂交种;而 $2n = 27$ (如 *L. caldwellii*, *L. squamigera*) 则是由 $2n = 16$ 的未减数配子与 $2n = 22$ 的正常配子的杂交种;普遍认为杂交在石蒜属物种形成中起关键作用(秦卫华等,2003)。本研究中将石蒜属 15 种 1 变种聚为 3 类,除中国石蒜、玫瑰石蒜和稻草石蒜外,与袁菊红等(2008)基于叶绿体基因 *trnL-F* 序列分析聚为 3 类一致。虽然忽地笑(6M + 10T)、玫瑰石蒜(22t)、石蒜(22t)和香石蒜(4M + 3T + 22t + 1m)的染色体数和核型存在一定差异,但它们的 *trnH-psbA* 序列信息位点相同,序列特征相近(表 2),并且叶的发生期均在秋季,聚在一起,表明它们的亲缘关系很近,该研究结论支持了袁菊红等(2008)认为忽地笑、石蒜和香石蒜等亲缘关系近,系统树中聚为一类的观点。该类物种间染色体组成存在一定差异可能与种间杂交有关,具体情况有待今后研究。

长筒石蒜、陕西石蒜、江苏石蒜、乳白石蒜、黄长筒石蒜、安徽石蒜、短蕊石蒜、鹿葱和稻草石蒜共 9 个物种聚为一类,说明其亲缘关系较近。该类物种除江苏石蒜和稻草石蒜的叶发生期在秋季外,其它均在春季发叶,染色体类型由中部和端部着丝粒染色体(M + T)与中部、端部和近端部着丝粒染色体混合型(M + T + t)组成(陕西石蒜和黄长筒石蒜的染色体组成未见报道除外),此类与袁菊红等(2008)(稻草石蒜系统位置除外)、张露等(2002)及形态学经典分类(邓传良和周坚,2005;周守标等,2005)基本一致。换锦花、红蓝石蒜和中国石蒜聚为一类,其中换锦花和红蓝石蒜的染色体数及核型均相同(22t),并且叶的发生期均在秋季,这与邓传良和周坚(2005)基于叶解剖结构特征研究表明换锦花和红蓝石蒜聚为一类,其亲缘关系较近的研究结论一致,但中国石蒜的染色体数目及核型(6M + 10T)与二者存在明显差异,并且叶的发生期在春季,其系统位置与张露等(2002)和 Shi 等(2006a)的研究结论不一致,其原因有待进一步研究。

总体来说,本研究中大多数石蒜属物种的分类与经典分类方法基本一致,但中国石蒜、忽地笑和玫瑰石蒜的系统位置存在一定分歧,出现矛盾的原因可能是叶绿体基因 *trnH-psbA* 序列不是外部性状的编码基因,且该序列较为保守,如陕西石蒜与江苏石蒜和鹿葱与短蕊石蒜的序列完全一致,这说明仅用该序列进行石蒜属物种鉴别或分类存在一定的局限性,需要与其它片段如核基因组的 ITS 和叶绿体基因组的 *rbcL*、*trnL-F* 等结合才能更准确的对石蒜属物种进行鉴定区分。尽管如此,

对于石蒜属植物具有花叶不遇, 种间差异不显著, 同时存在种内形态差异较大的特性, 从形态学等方面难以鉴定而言, 其叶绿体 *trnH-psbA* 序列变异特征为部分物种鉴别可以提供有力的分子证据, 以及为阐明石蒜属种间关系和系统进化也具有一定的理论和现实指导意义。

References

- Deng Chuan-liang, Zhou Jian. 2005. A cladistic analysis of *Lycoris* (Amaryllidaceae). Bulletin of Botanical Research, 25 (4): 393 – 399. (in Chinese)
- 邓传良, 周 坚. 2005. 石蒜属植物分支系统学分析. 植物研究, 25 (4): 393 – 399.
- Hsu P S, Kurita S, Yu Z Z, Lin J Z. 1994. Synopsis of the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). Sida, 16: 301 – 331.
- Kurita S, Hsu P S. 1996. Hybrid complex in *Lycoris* (Amaryllidaceae). American Journal of Botany, 83 (6, Supplement): 207. (Abstract)
- Qin Wei-hua, Zhou Shou-biao, Wang Heng-ying, Wang Hui. 2003. Advances in *Lycoris* Herb. Journal of Anhui Normal University: Natural Science, 26 (4): 385 – 390. (in Chinese)
- 秦卫华, 周守标, 汪恒英, 王 晖. 2003. 石蒜属植物的研究进展. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 26 (4): 385 – 390.
- Shi S D, Qiu Y X, Li E X, Fu C X. 2006a. Phylogenetic relationships and possible hybrid origin of *Lycoris* species (Amaryllidaceae) revealed by ITS sequences. Biochemical Genetics, 44 (5): 198 – 208.
- Shi S D, Qiu Y X, Wu L, Fu C X. 2006b. Interspecific relationships of *Lycoris* (Amaryllidaceae) inferred from inter-simple sequence repeat data. Scientia Horticulturase, 110 (3): 285 – 291.
- Wu Ling, Lu Yi-jun, Shi Shu-de, Fu Cheng-xin. 2007. Analysis of inter-species relationship of *Lycoris* by use of ITS sequence. Subtropical Plant Science, 36 (1): 31 – 35. (in Chinese)
- 吴 玲, 卢毅军, 史树德, 傅承新. 2007. 中国石蒜属种间亲缘关系 ITS 序列分析. 亚热带植物学报, 36 (1): 31 – 35.
- Xie Jun, Tan Feng, Feng Wei, Chen Bin. 2007. Advances in studies on classification, identification, medicinal ingredients, and biotechnological application of plants in *Lycoris* Herb. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 38 (12): 1902 – 1905. (in Chinese)
- 谢 峻, 谈 锋, 冯 巍, 陈 斌. 2007. 石蒜属植物分类鉴别、药用成分及生物技术应用研究进展. 中草药, 38 (12): 1902 – 1905.
- Xu Yin, Hu Zhi-bi, Huang Xiu-lan, Fan Guang-jin. 1985. Flora reipublicae popularis sinicae. Vol. 16, No. 1. Beijing: Science Press: 16 – 27. (in Chinese)
- 徐 垠, 胡之璧, 黄秀兰, 范广进. 1985. 中国植物志. 第 16 卷第 1 分册. 北京: 科学出版社: 16 – 27.
- Yuan Ju-hong, Hu Mian-hao. 2009. A review on germplasm resources of *Lycoris* and its exploitation and utilization. Subtropical Plant Science, 38 (2): 79 – 84. (in Chinese)
- 袁菊红, 胡绵好. 2009. 石蒜属种质资源及其开发利用研究 (综述). 亚热带植物学报, 38 (2): 79 – 84.
- Yuan Ju-hong, Sun Shi, Peng Feng, Feng Xu, Xia Bing. 2007. Comparison between ISSR and RAPD markers in genetic diversity of plants in *Lycoris* Herb. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 38 (10): 1555 – 1561. (in Chinese)
- 袁菊红, 孙 视, 彭 峰, 冯 煦, 夏 冰. 2007. 石蒜属植物遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 标记比较研究. 中草药, 38 (10): 1555 – 1561.
- Yuan Ju-hong, Sun Shi, Peng Feng, Feng Xu, Zheng Yu-hong, Xia Bing. 2008. Genetic variations in *trnL-F* sequence and phylogenetic clustering of *Lycoris* species. China Journal of Chinese Materia Medica, 33 (13): 1523 – 1527. (in Chinese)
- 袁菊红, 孙 视, 彭 峰, 冯 煦, 郑玉红, 夏 冰. 2008. 石蒜属叶绿体 *trnL-F* 序列的变异与系统聚类分析. 中国中药杂志, 33 (13): 1523 – 1527.
- Zhang Lu, Cai You-ming, Zhuge Qiang, Lou Lu-huan, Zou Hui-yu, Huang Min-ren, Wang Ming-xiu. 2002. Analysis of the inter-species relationships on *Lycoris* (Amaryllidaceae) by use of RAPD. Acta Genetica Sinica, 29 (10): 915 – 921. (in Chinese)
- 张 露, 蔡友铭, 诸葛强, 楼炉煊, 邹惠渝, 黄敏仁, 王明麻. 2002. 石蒜属种间亲缘关系 RAPD 分析. 遗传学报, 29 (10): 915 – 921.
- Zhao Tian-rong, Shi Yong-tai, Cai Jian-gang, Ni Jian-gang. 2008. The headway of research in *Lycoris*. Northern Horticulture, (4): 65 – 69. (in Chinese)
- 赵天荣, 施永泰, 蔡建岗, 倪建刚. 2008. 石蒜属植物的研究进展. 北方园艺, (4): 65 – 69.
- Zhou Shou-biao, Yu Ben-qi, Luo Qi, Qin Wei-hua, Wang Ying. 2005. Pollen morphology of *Lycoris* Herb. and its taxonomic significance. Acta Horticulturae Sinica, 32 (5): 914 – 917. (in Chinese)
- 周守标, 余本祺, 罗 琦, 秦卫华, 王 影. 2005. 石蒜属植物花粉形态及分类研究. 园艺学报, 32 (5): 914 – 917.