

# 基于 AFLP 分子标记技术的黑花韭与多星韭遗传多样性与亲缘关系分析

王 锦<sup>1</sup>, 何承中<sup>1</sup>, 党承林<sup>2</sup>, 黄瑞复<sup>2</sup>

(1. 西南林业大学, 昆明 650224; 2. 云南大学 生命科学学院, 昆明 650031)

**摘要:** 采用 AFLP 分子标记技术分析了分布在滇中、滇西、滇西北的 3 个黑花韭居群、3 个二倍体多星韭居群和 6 个四倍体多星韭居群的遗传多样性与亲缘关系。结果表明, 12 个居群在 DNA 水平上已发生明显分化。居群间的基因分化系数( $G_{ST}$ )为 0.444。由  $G_{ST}$  计算的居群间基因流( $N_m$ )为 0.625, 表明居群间部分基因流动受阻。12 个居群间的遗传距离( $D$ )在 0.019~0.298 之间, 平均为 0.185。UPGMA 聚类结果表明居群聚类关系与地理分布相近似。四倍体多星韭与黑花韭的遗传距离较与二倍体多星韭的遗传距离要小。二倍体多星韭与黑花韭的遗传距离最大, 它们之间的亲缘关系最远。

**关键词:** 黑花韭; 多星韭; 遗传多样性; 亲缘关系

**中图分类号:** Q152; Q157 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)03-0295-05

## Genetic diversity and relationship of *Allium tchongchanense* and *A. wallichii* based on AFLP analysis

WANG Jin<sup>1</sup>, HE Cheng-Zhong<sup>1</sup>, DANG Cheng-Lin<sup>2</sup>, HUANG Rui-Fu<sup>2</sup>

(1. Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650031, China)

**Abstract:** Genetic diversity and relationship of 12 populations of *Allium tchongchanense* and *A. wallichii* which distributed in the central region, western region and northwestern region of Yunnan Province were analyzed by AFLP. The results showed that there was obvious genetic differentiation among populations. Genetic differentiation coefficient  $G_{ST}=0.444$ .  $N_m=0.625$  calculated by  $G_{ST}$  showed that gene flow was interrupted among populations. The genetic distance( $D$ ) of 12 populations was 0.019—0.298, average 0.185. UPGMA cluster results showed that genetic distance relationship was in accordance with geographic distribution. The genetic distance between *A. wallichii* tetraploid and *A. tchongchanense* was smaller than that between *A. wallichii* tetraploid and *A. wallichii* diploid. The genetic distance was the largest between *A. wallichii* diploid and *A. tchongchanense*.

**Key words:** *Allium tchongchanense*; *A. wallichii*; genetic diversity; relationship

黑花韭 (*Allium tchongchanense*)、多星韭 (*A. wallichii*) 均为百合科 (Liliaceae) 葱属粗根组 (sect. *Bromatorriza*) 的植物, 它们营养体差异很大, 但花

的构造差异不大。在学术界, 关于黑花韭和多星韭的分类学处理存在分歧, 《中国高等植物图鉴》(1980) 中, 把黑花韭定为独立的分类学种; 但许介眉

收稿日期: 2010-10-27 修回日期: 2011-03-07

基金项目: 国家林业局“948”项目(2008-4-11); 云南省级重点学科、云南省高校重点实验室及西南林业大学实验室共享平台基金(200826)[Supported by the “948” Item of State Forestry Bureau(2008-4-11); Yunnan Key Discipline, Yunnan College and University Key Laboratory for Ornamental Plant and Horticulture and Southwest Forestry University Sharing Platform(200826)]

作者简介: 王锦(1966-), 女, 北京市人, 博士, 教授, 主要研究方向为植物生态遗传、园林生态和观赏园艺, (E-mail)908505685@qq.com.

在《中国植物志》(1980)中,将黑花韭归并为多星韭,作为多星韭的异名。多星韭有二倍体和四倍体两种核型,在不同的分布区,植株形态和花的构造存在一定的差异(晏一祥等,1990)。云南大学生命科学院对多星韭和黑花韭的研究较早,自20世纪90年代以来先后有多位硕士研究生对多星韭(按《中国植物志》分类处理)居群在生态、细胞学、遗传结构等方面进行了初步研究,并取得了一些研究成果(邹晓菊,1997;李曼碧,1998;蔡小虎,1999;黄骥,2000)。王锦等(2006)还对多星韭生态遗传学研究进展进行了综述。但目前还未见从分子水平对多星韭和黑花韭遗传多样性和亲缘关系研究的报道。本文以云南为重点,在黑花韭和多星韭居群分布较为集中的滇中、

滇西、滇西北3个地区进行广泛调查和采样,采用 AFLP 分子标记技术分析黑花韭和多星韭遗传多样性和亲缘关系。研究结果旨在为这两个种的划分提供分子遗传学依据,为其生物多样性保护、花卉新品种选育和野生花卉资源开发利用提供科学参考。

## 1 分布与生境

在黑花韭与多星韭主要分布地区,根据其分布的海拔梯度和生境特征,重点调查了12个典型居群。黑花韭和多星韭的生境复杂多样,为方便起见,本文将其生境分为岩溶型、岩生型、灌草型、林地型、草甸型5种类型。各居群编号、地点、地理位置、海

表1 12个居群的生境概况  
Table 1 Habitats of 12 populations

分区 Zone	居群编号 Population No.	采样地点 Sampling site	经度、纬度 Longitude, Latitude	海拔(m) Elevation	生境特点 Habitat	生境类型 Habitat type
滇中	L1	昆明梁王山垭口处	102°54' E, 24°43' N	2 720	石灰岩坡地,光照充足,较干燥	岩溶型
滇中	L2	昆明梁王山公路旁	102°54' E, 24°43' N	2 700	灌草丛,较荫蔽,潮湿	灌草型
滇中	L3	昆明梁王山公路旁	102°54' E, 24°43' N	2 500	林缘灌草丛,光照较充足,较湿润	灌草型
滇中	L4	昆明梁王山公路旁	102°54' E, 24°43' N	2 450	华山松林,较荫蔽,潮湿	林地型
滇西	J1	宾川鸡足山木香坪	100°20' E, 25°56' N	3 270	亚高山草甸,光照较充足,潮湿	草甸型
滇西	J2	宾川鸡足山茅棚一华首门	100°20' E, 25°56' N	3 105	灌草丛,光照较充足,较湿润	灌草型
滇西	J3	宾川鸡足山茅棚一大悲阁	100°20' E, 25°55' N	3 080	玄武岩石砾中,光照充足,较干燥	岩生型
滇西	J4	宾川鸡足山太子阁	100°20' E, 25°55' N	3 060	玄武岩岩壁缝隙,光照充足,湿润	岩生型
滇西	J5	宾川鸡足山遇君堂	100°20' E, 25°55' N	2 450	云南松、元江栲针阔混交林,较荫蔽、潮湿	林地型
滇西	D	保山瓦窑道人山	99°15' E, 25°32' N	3 300	亚高山草甸,光照较充足,潮湿	草甸型
滇西北	S1	香格里拉高山植物园后	99°38' E, 27°53' N	3 380	亚高山草甸,光照较充足,潮湿	草甸型
滇西北	S2	香格里拉普达措国家公园	99°54' E, 27°48' N	3 300	亚高山草甸,光照较充足,潮湿	草甸型

注: L1、J3、J4 为黑花韭居群; D、S1、S2 为二倍体多星韭居群; L2、L3、L4、J1、J2、J5 为四倍体多星韭居群。

Note: L1, J3 and J4 as *Allium tchongchanense* populations; D, S1, S2 as *A. wallichii* diploid populations; L2, L3, L4, J1, J2, J5 as *A. wallichii* tetraploid populations.

拔、生境见表1。

## 2 材料与方方法

### 2.1 材料

依据随机取样的原则,居群内个体数较多时,随机采取30株个体作为分析样本,样株间相隔约50m,居群内个体数少于30株时,全部取样。采集新鲜叶片为材料进行试验。

### 2.2 基因组DNA提取

采用改良 SDS 法依照标准酚/氯仿流程(Murray & Thompson, 1980)提取基因组DNA,用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量,用紫外分光光度计(Spek1-1300)检测其浓度,最后分取各样本50

$\mu\text{L}$  DNA 混合样品稀释至20 ng/ $\mu\text{L}$ ,保存于-20℃冰箱备用。

### 2.3 AFLP 分析

AFLP 分析的基本程序按 Vos 等(1995)所描述的方法进行,仅依据本实验室的前期经验对体系进行优化。采用 EcoRI/MseI 酶切组合进行基因组限制性酶切,预扩增反应选用引物组合 E00/M00,选择性扩增反应采用引物组合 E+3/M+3。PCR 扩增反应在 PTC-100™ Thermal PCR 仪上进行。选择性 PCR 产物与双指示剂(变性液)按 2.5:1 的比例混合,于 95℃进行变性 5 min 后立即放置于冰水混合物中。取 6  $\mu\text{L}$  热变性后的混合液上样,在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶中 90W 恒功率电泳约 90 min。电泳结束后采用银染检测法进行 AFLP 指纹

显色(Tixier 等,1997)。

## 2.4 数据统计分析

按电泳图谱中同一位置上 AFLP 条带的有无进行统计,有带记为“1”,无带记为“0”,形成 0/1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE 1.31 软件(Yeh 等,1997)在假定居群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下,对全部居群和各单个居群分别进行遗传参数分析,计算多态位点百分率( $P$ )、观测等位基因数( $N_o$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、Nei's 基因多样性指数( $H$ )、Shannon 信息指数( $I$ )、以及居群间的 Nei's 遗传距离,采用 UPGMA 方法对 24 个居群进行聚类分析。居群间基因流的定量估测是通过公式  $N_m = (1 - G_{ST}) / 4 G_{ST}$  间接推算(Wright,1978)。进一步采用 WINAMOVA 1.55 软件(Excoffier,1993)对品种间以及品种内的分子变异进行分析(AMOVA),同时算得品种间的基因分化系数( $\Phi_{ST}$ )。POPGENE 1.31 软件和 WINAMOVA 1.55 软件的输入文件由 DCFA 1.1 软件(张富民等,2002)制作。WINAMOVA 1.55 软件分析的显著性检验采用 1 000 次置换。

## 3 结果与分析

不同的 E+3/M+3 引物组合可产生不同数量及大小的 AFLP 片段,5 对引物组合分别检测到 69~73 个 AFLP 标记,平均每对引物组合可检测出 71.4 个;5 对 AFLP 引物组合共检测到多态性标记 348 个,多态性水平最高者为引物组合 E-AGT/M-ATG,达 100%,最低者为引物组合 E-GAA/M-AAC,其多态性水平为 93.06%,每对 AFLP 引物组合平均可产生 69.6 个多态性标记(表 2)。

从 42 对引物组合中筛选出了 5 对 AFLP 引物组合 E-AAT/M-GAC、E-ACT/M-AGG、E-AGT/M-ATG、E-ATG/M-TAC、E-GAA/M-AAC 用于居群遗传相似性研究。5 对 AFLP 引物组合共检测到 357 个标记,其中 348 个是多态的。在居群水平上的多态性标记在 23.53%~78.99% 之间,平均为 55.95%,多态性水平最高者为梁王山 L4 居群,最低者为香格里拉 S2 居群,居群遗传变异程度依次为 L4>J2>L3>L2>J1>J5>D>L1>J4>J3>S1>S2;居群水平上的观测等位基因数在 1.235~1.790 之间,平均为 1.560 个,有效等位基因数在 1.125~1.380 之间,平均为 1.258 个;Nei's 基因多样性指

数在 0.084~0.226 之间,平均为 0.162,Shannon 信息指数在 0.130~0.351 之间,平均为 0.254,其大小变化规律与各居群多态性标记百分率的大小趋势相似(表 3)。

表 2 AFLP 选择性扩增引物产生的条带多态性

Table 2 AFLP selective amplification of polymorphic primer bands

引物组合 Primer combination	扩增总带数 No. of bands	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性水平 Polymorphism (%)
E-AAT/M-GAC	73	72	98.63
E-ACT/M-AGG	71	69	97.18
E-AGT/M-ATG	72	72	100
E-ATG/M-TAC	69	68	98.55
E-GAA/M-AAC	72	67	93.06
总和 Total	357	348	487.4
平均 Average	71.4	69.6	97.48

WINAMOVA 分析结果表明,12 个居群间的遗传变异分量为 22.423,占总遗传变异的 33.16%;而居群内遗传变异分量为 45.192,占总遗传变异的 66.84%。居群间存在极显著的遗传分化( $\Phi_{ST} = 0.332, P < 0.001$ ), $\Phi_{ST}$  相当于分化指数(表 4)。

POPGENE 分析结果表明,12 个居群间的基因分化系数( $G_{ST}$ )为 0.444,即有 44.4% 的遗传变异存在于居群间,而居群内不同个体之间的遗传变异占 55.6%。由  $G_{ST}$  计算的居群间基因流( $N_m$ )为 0.6254,表明居群间部分基因流动受阻。由居群间基因分化系数和基因流值可见,12 个居群间的基因交流较少,各居群间由于生殖上的部分隔离和隔离已经出现了较明显的分化趋向。

12 个居群间的遗传距离( $D$ )在 0.019~0.298 之间,平均为 0.185。其中,梁王山多星韭四倍体居群 L3 与 L4 居群间的遗传距离最小, $D=0.019$ ,而鸡足山多星韭四倍体居群 J5 与香格里拉多星韭二倍体居群 S1 居群间的遗传距离最大, $D=0.298$ (表 5)。

根据 Nei's 遗传距离,采用 UPGMA 方法对 12 个居群的聚类结果表明,在阈值为 0.10 处将 12 个居群划分为两大组,第 1 组由梁王山 4 个居群和鸡足山 5 个居群构成,而第 2 组包含了香格里拉 2 个居群和道人山居群,聚类关系与地理分布相近似(图 1)。

## 4 讨论

12 个居群基因位点的多态性异常丰富,多态位

表 3 12 个居群的样本数和遗传多样性指数  
Table 3 Samples and diversity index of 12 populations

居群编号 Population No.	样本数 Sample number	多态性带数 No. of poly- morphic bands	多态率 Polymorphism (%)	$N_o$	$N_e$	$H$	$I$
L1	18	203	56.86	1.569±0.496	1.268±0.324	0.167±0.178	0.260±0.259
L2	24	238	66.67	1.667±0.472	1.278±0.300	0.180±0.167	0.285±0.244
L3	30	245	68.63	1.686±0.465	1.305±0.288	0.198±0.165	0.312±0.242
L4	20	282	78.99	1.790±0.408	1.365±0.334	0.226±0.175	0.351±0.244
J1	17	234	65.55	1.656±0.476	1.265±0.295	0.172±0.166	0.273±0.242
J2	18	249	69.75	1.698±0.460	1.302±0.310	0.193±0.170	0.303±0.245
J3	16	153	42.86	1.429±0.496	1.218±0.313	0.135±0.176	0.208±0.259
J4	19	178	49.86	1.499±0.501	1.248±0.326	0.152±0.181	0.235±0.264
J5	13	217	60.78	1.608±0.489	1.313±0.343	0.191±0.186	0.292±0.268
S1	14	104	29.13	1.291±0.455	1.125±0.226	0.084±0.140	0.134±0.216
S2	13	84	23.53	1.235±0.425	1.146±0.291	0.087±0.163	0.130±0.239
D	10	210	58.82	1.588±0.493	1.257±0.304	0.164±0.170	0.259±0.250
居群水平 Population level		199.8±59.93	55.95±16.79	1.560±0.168	1.258±0.068	0.162±0.043	0.254±0.068
种水平 Species level	212	348	97.48	1.975±0.157	1.443±0.259	0.285±0.126	0.446±0.162

表 4 居群间和居群内分子变异的 AMOVA 分析  
Table 4 AMOVA analysis of molecular variation among populations and within population

变异来源 Source of variation	自由度 DOF	总方差 Total variance	平均方差 Average variance	变异组分 Variation components	变异百分率 Variation percentage(%)	$P$	$\Phi_{ST}$
居群间 Among populations	11	3719.41	338.128	22.423	33.16	<0.001	0.332
居群内 Within populations	150	6778.87	45.192	45.192	66.84	<0.001	
总计 Total	161	10498.28					

表 5 12 个居群间的 Nei's 遗传距离  
Table 5 Nei's genetic distance among 12 populations

居群 Population No.	L1	L2	L3	L4	J1	J2	J3	J4	J5	S1	S2	D
L1												
L2	0.084											
L3	0.164	0.183										
L4	0.168	0.176	0.019									
J1	0.169	0.179	0.151	0.156								
J2	0.184	0.186	0.169	0.176	0.166							
J3	0.060	0.080	0.086	0.086	0.131	0.152						
J4	0.057	0.086	0.166	0.166	0.169	0.172	0.052					
J5	0.207	0.217	0.183	0.190	0.065	0.188	0.158	0.197				
S1	0.254	0.273	0.257	0.258	0.257	0.259	0.236	0.274	0.298			
S2	0.276	0.286	0.277	0.270	0.269	0.245	0.255	0.287	0.296	0.213		
D	0.186	0.199	0.178	0.187	0.184	0.166	0.159	0.200	0.224	0.140	0.167	

点高达 97.48%。在居群水平上的多态性标记在 23.53%~78.99%之间,平均为 55.95%;每个位点在居群水平上的观测等位基因数在 1.235~1.790 之间,平均为 1.560 个,有效等位基因数在 1.125~1.380 之间,平均为 1.258 个;这是 12 个居群形态性状多态性丰富多样的遗传学基础;四倍体居群在

这三个指标上均大于二倍体居群,四倍体居群有更高的多态性和变异性,因而四倍体居群分化剧烈,分布范围比二倍体居群更为广泛。班勇(1995)认为,广泛分布的物种常常维持较高的遗传变异,而环境因子变化较大,又对广布种多态性的维持起着较大的作用。

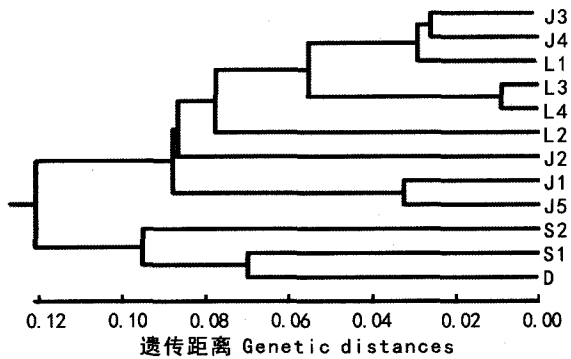


图 1 基于 Nei's 遗传距离的 12 个居群 UPGMA 聚类图  
Fig. 1 UPGMA dendrogram of 12 populations based on Nei's genetic distances

12 个居群间的基因分化系数( $G_{ST}$ )为 0.444, 即有 44.4% 的遗传变异存在于居群间, 而居群内不同个体之间的遗传变异占 55.6%, 居群内不同个体间的变异是遗传多样性的主要来源。由  $G_{ST}$  计算的居群间基因流( $N_m$ )为 0.6254, 表明居群间部分基因流动受阻。各居群间由于生殖上的部分隔离和隔离已经出现了较明显的分化趋向。多星韭的繁育系统通常为异花授粉, 居群内和居群间均能发生重组和基因流动, 但各居群特别是小居群都发生不同程度的遗传漂变, 并且不同生境和地区居群间存在一定的地理隔离, 阻碍了基因流动, 因而各居群的遗传基础会有所不同。而不同的选择压力作用于相似或相异的遗传基础, 造成各居群间的遗传差异, 并导致它们在物候、形态、核型及适应性等方面的分化。

12 个居群间的遗传距离( $D$ )在 0.019~0.298 之间, 平均为 0.185。四倍体多星韭与黑花韭的遗传距离较小, 而与二倍体多星韭的遗传距离较大, 说明四倍体多星韭与黑花韭之间的亲缘关系较近。四倍体多星韭的二倍化程度很高, 说明它是部分异源四倍体起源, 并且已经历了一个较长的二倍体化过程(杨爽等, 2007; 赵丽莉等, 2008)。所调查的 12 个居群中, 四倍体多星韭居群与黑花韭居群为同域分布, 黑花韭可能就是四倍体多星韭的亲本之一。四倍体多星韭生境多样, 既有林地型也有灌草型和亚高山草甸型, 表明它是成功的多倍体, 除了多倍性本身具有的广泛重组等原因外, 二倍体化程度高是其成功的重要原因。异源多倍体在形态上往往与亲本二倍体不连续, 表现为清楚可分的种, 所以较易赢得分类学家的认可(徐炳声, 1998)。二倍体多星韭与黑花韭的遗传距离最大, 它们之间的亲缘关系最远。

## 参考文献:

- 中国高等植物图鉴编委. 1980. 中国高等植物图鉴(第 5 册) [M]. 北京: 科学出版社: 22-32
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1980. 中国植物志(第 14 卷)[M]. 北京: 科学出版社: 210-211
- Ban Y(班勇). 1995. Plant life history strategies[J]. *Chin J Appl Ecol* (生态学杂志), **14**(3): 33-39
- Cai XH(蔡小虎). 1999. A study on population differentiation of *Allium wallichii* in Yunan Province[D]. Yunnan University
- Excoffier L. 1993. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) Version 1.55[R]. Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland
- Hsu PS(徐炳声). 1998. The species problem in plant taxonomy in China[J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), **36**(5): 470-480
- Huang J(黄骥). 2000. The ecological genetics of *Allium wallichii* in Liangwang Mountain Kunming area[D]. Yunnan University
- Li MB(李曼碧). 1998. A study on population variation and differentiation of *Allium wallichii* in Kunming area[D]. Yunnan University
- Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA[J]. *Nucl Acid Res*, **8**: 4 321-4 325
- Tixier MH, Sourdille RM, Leroy P, et al. 1997. Detection of wheat microsatellites using a non radioactive silver nitrate staining method[J]. *J Genet Breed*, **51**: 175-177
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucl Acid Res*, **23**: 4 407-4 414
- Wright S. 1978. Evolution and Genetics of Populations, Vol 4, Variability within and among natural populations[M]. Chicago: University of Chicago press
- Yan YX(晏一祥), Huang RF(黄瑞复), Wei RC(魏蓉城), et al. 1990. Studies on the karyotype of 5 samples of *Allium* sect. *Bromatorrhiza* Ekberg[J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **28**(3): 177-184
- Yang S(杨爽), Wang J(王锦). 2007. Study on cytological karyotype of *Allium wallichii* in Liangwang mountain area, Yunnan Province[J]. *J Southwest For Coll* (西南林学院学报), **27**(5): 38-41
- Yeh F, Yang RC, Boyle T, et al. 1997. A user-friendly shareware for population genetic analysis[R]. Molecular and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton
- Zhang FM(张富民), Ge S(葛颂). 2002. Data analysis in population genetics. I. analysis of RAPD data with AMOVA [J]. *Biodivers Sci* (生物多样性), **10**(4): 438-444
- Zhao LL(赵丽莉), Wang J(王锦). 2008. The study on karyotype of *Allium wallichii* in Jizu Mountain, Yunnan Province[J]. *Shandong For Sci Tech* (山东林业科技), **38**(3): 1-3
- Zou XJ(邹晓菊). 1997. Cytological studies on several populations of *Allium wallichii* in Jizu Mountain Dali area and Kunming area[D]. Yunnan University
- Wang J(王锦), Dang CL(党承林). 2006. Research progress on ecological genetics of *Allium wallichii*[J]. *For Inv Plan* (林业调查规划), **31**(2): 93-95