

丁香属植物亲缘关系的 AFLP 分析

高洪晓¹ 杨凯² 刘建斌^{1*}

(1. 北京农学院 园林学院, 北京 102206;

2. 北京农学院 农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要 为探讨丁香属植物种间、欧丁香品种间以及丁香属与女贞属之间的亲缘关系,本研究使用 8 对选择性扩增引物对丁香属 14 个种、欧丁香种的 37 个品种和女贞属 3 个种进行了 AFLP 分析。利用 Ntsyspc 软件对扩增结果进行分析,以遗传相似性系数为基础,计算 Nei 遗传距离并采用 UPGMA 法进行聚类。结果表明:AFLP 扩增共产生 447 条带,其中多态性条带 395 条,多态率为 88.4%,各样品间的遗传距离在 0.01~1.44 之间。聚类结果与传统的分类结果基本一致,不同之处在于:部分欧丁香品种与顶生花序系的种聚类为一个分支;短花冠管组的种聚类于长花冠管组的内部;长花冠管组的种内部巧玲花系与顶生花序系的种聚类有交叉现象;女贞属植物聚类于丁香属植物的内部。据此推断,欧丁香品种的育种过程中有顶生花序系的种的加入;丁香属植物的分类应该去除组的划分;巧玲花系与顶生花序系的亲缘关系比较近;丁香属植物不是一个自然的单系类群,女贞属与丁香属之间的起源与分类学地位有待于进一步的研究。

关键词 丁香种; 欧丁香品种; AFLP; 多样性

中图分类号 S 685.26

文章编号 1007-4333(2011)05-0050-05

文献标志码 A

Analysis of the phylogenetic relationship of *Syringa* by AFLP technique

GAO Hong-xiao¹, YANG Kai², LIU Jian-bin^{1*}

(1. Landscape Design & Forestry College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;

2. Key Laboratory of Agricultural New Technology and Application in Beijing,

Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract To explore the relationships among *Syring vulgaris*, species of *Syringa*, *Syringa* and *Ligustrum*, eight EcoRI / Mse I primer combinations were used for AFLP molecular marker technique. The genetic diversity of 14 *Syringa* species, 37 cultivars of *S. vulgaris* and 3 *Ligustrum* species were evaluated. NTSYS was used to compute the genetic distance and UPGMA for clustering analysis. The results showed that about 447 discernable bands were obtained, 395 being polymorphic with the percentage of 88.4%. The genetic distance computed by NTSYS was from 0.01 to 1.44. There were some differences between the clustering analysis and traditional taxonomic method, in which some *Syring vulgaris* were clustered with *Ser. villosae*, sect *Ligustrina* with *Ser. syringa*, species in *Ser. villosae* and *Ser. pubescente*, the *Ligustrum* species of *S. pinnatifolia* and *S. microphylla*. It implied that *Ser. villosae* participated the breeding process of some *Syringa vulgaris*. The classification of *Syringa* should break into two sects divide. *Ser. villosae* had a close relationship with *Ser. pubescente*. *Syringa* had a complex phylogenetic relationship. The further study is required for the origin and classification relationship of *Syringa* and *Ligustrum*.

Key words *Syringa* species; cultivars of *S. vulgaris*; AFLP; diversity

收稿日期: 2011-01-05

基金项目: 北京市教委科技计划面上项目(KM200510020003)

第一作者: 高洪晓, 硕士研究生, E-mail: xyls6868@163.com

通讯作者: 刘建斌, 副教授, 主要从事园林植物栽培与育种方面的研究, E-mail: ljb61@163.com

丁香属 (*Syringa* Linn.) 植物是木犀科 (Oleaceae) 的灌木或小乔木, 全世界约 27 种, 自然分布于东亚、中亚和欧洲。中国约有 22 个种, 其中特有种 18 种; 日本、朝鲜、阿富汗等国家产 6 种; 欧洲产 2 种^[1]。长期以来, 丁香属植物研究的突出问题始终表现在分类学研究方面。中国是丁香属植物的栽培起源中心, 因为具有丁香属植物丰富的种质资源而在该属植物的分类学研究方面具有得天独厚的优势^[1]。

目前, 关于丁香属植物分类学方面的研究主要有: 使用 cpDNA、rDNA 以及核糖体 ITS 和 ETS 信息研究丁香属及女贞属种的系统演化^[2-3], 运用 RAPD 指纹技术鉴别丁香属部分种和品种, AFLP 指纹技术鉴定部分品种或研究某个种不同分布区的遗传多样性^[4-7]。运用过氧化物同功酶分析研究部分种及变种的遗传差异及亲缘关系^[8]。

在以往的研究中, 由于取样、试验方法及统计方法的不同, 所得结果不尽相同, 特别是对丁香属种的系统演化问题的解答中, 其正确性尚值得商榷^[9]。存在争议的主要问题有: 丁香属植物是否可以划分为 2 个组; 长花冠管组内部各个系之间的关系; 羽叶丁香是否可以作为一个独立的系与其他系并列^[10]; 丁香属与女贞属之间的系统关系。

本研究以北京地区部分丁香属植物为研究基础, 将 AFLP 技术应用于丁香多个种和欧丁香品种之间的亲缘关系的研究, 旨在从分子标记方面揭示该属植物的遗传多样性, 探讨以上有争议的问题, 为该属植物的分类学和杂交育种学研究提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料采自北京农学院校园和丁香资源圃, 其中包括丁香属 14 个种(涵盖丁香属 2 个组和短花冠管组的 4 个系)、欧丁香种的 37 个品种和女贞属 3 个种。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

采用改进的 CTAB 法^[11] 进行丁香叶片 DNA 提取, 用 0.8% 的琼脂糖检测 DNA 质量, 置于 4 °C 冰箱保存, 备用。

1.2.2 AFLP 体系的建立

整个 AFLP 流程参照 Vos^[12] 的方法, 做一定程度的改变。酶切与连接同时进行, 反应总体积为 20

μL , 其中目标 DNA 4 μL , *Eco*R I (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 0.3 μL , *Mse* I (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 0.25 μL , T4 Ligase (7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 0.2 μL , T4 DNA Ligase Buffer 2 μL , Ea (50 pmol/ μL) 0.12 μL , Ma (50 pmol/ μL) 0.6 μL , ddH₂O 12.5 μL , 此混合液在 25 °C 温育 4 h; 预扩增反应体系为 20 μL , 其中切接产物 4 μL , *rTaq* 0.2 μL , Moo (50 ng/ μL) 1.5 μL , Eoo (50 ng/ μL) 1.5 μL , 10 倍 PCR Buffer 2 μL , 2.5 mmol/L dNTP 1.6 μL , ddH₂O 9.2 μL 。选择性扩增采用预扩增稀释 20 倍产物, 从 18 对引物组合中筛选出 8 对引物组合作为最终的数据统计引物。采用银染技术检测扩增结果, 使用 6% 的聚丙烯酰胺胶在 75 W 恒功率下电泳 1.5 h; 电泳结束后, 银染检测; 干胶后照相, 扫描。

1.2.3 数据处理

采用生物学统计软件 NTSYSpc 进行分析。以“0”和“1”的方式对电泳结果(图 1)的条带进行记录, 有条带赋值“1”, 无条带赋值“0”, 将数据输入 Excel 表格后录入 NTSYSpc 获得数据文件。以遗传相似性系数为基础, 计算 Nei 遗传距离, 采用 UPGMA 对数据进行聚类分析。

多态性比率/% = (多态性 AFLP 条带数/总 AFLP 条带数) × 100

2 结果与分析

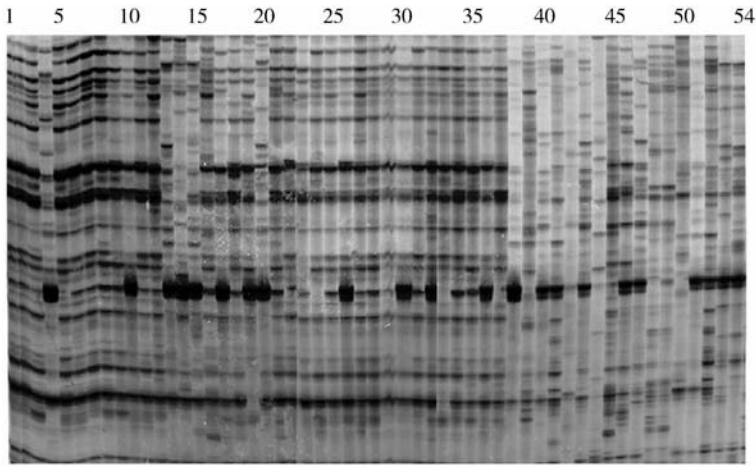
2.1 扩增结果

8 对引物组合共扩增出 447 条带, 其中多态性条带 395 条, 多态率为 88.4%, 这表明供试样品间存在很高的遗传多样性。各引物对扩增所得条带数、多态性带数和多态性比率见表 1, 部分引物扩增图谱见图 1。

表 1 AFLP 分析所用引物组合及扩增结果统计

Table 1 Statistic of primer combination and amplified results of AFLP analysis

引物组合	总扩增条带数	多态性扩增条带数	多态性比率/%
M-TAC/E-AAC	62	56	90.3
M-TAG/E-AAC	58	48	82.8
M-TAT/E-AAA	76	65	85.5
M-GTT/E-CGA	45	41	91.1
M-CAC/E-AAC	50	40	80.0
M-CAG/E-AAA	43	39	90.7
M-CAC/E-AAA	47	43	91.5
M-CAG/E-AAC	66	63	95.5
总计	447	395	88.4



1~37 为欧丁香品种;38~52 为丁香种;53~54 为女贞属种。

图1 丁香属和女贞属植物 AFLP 电泳图谱(引物 M-TAT/E-AAA)

Fig. 1 Electrophoretogram of AFLP amplificates from *Syringa* and *Ligustrum* with primer M-TAT/E-AAA

2.2 遗传距离和聚类分析

Nei 遗传距离的计算结果表明,供试材料的遗

传距离在 0.01~1.44 之间。利用 UPGMA 法进行聚类,聚类结果见图 2。

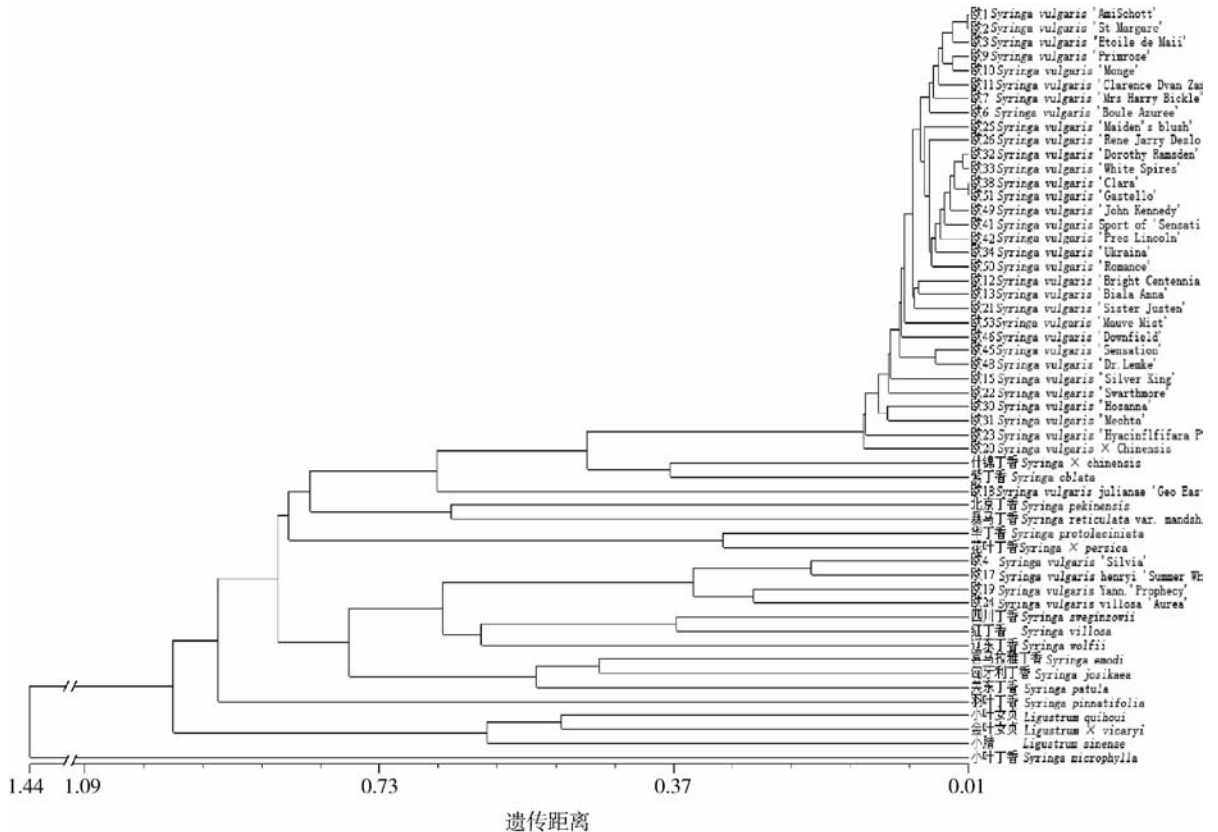


图2 根据 AFLP 分子标记聚类分析产生的树状分支图

Fig. 2 A dendrogram based on AFLP markers generated by UPGMA

图2可示:欧丁香品种聚类结果与形态学特征相符,33个欧丁香品种中29个聚类为一个大的分支且位于欧丁香系内部,遗传距离在0.01~0.14之间,这说明这些欧丁香品种之间亲缘关系很近,它们应该有着共同的系统来源;其余4个明显具有顶生花序系形态学特点的品种聚类于顶生花序系内部。这说明欧丁香品种在育种过程中有顶生花序系的种的加入。

种一级聚类结果与传统的形态学分类结果比较相近,欧丁香系和顶生花序系中的各个种分别聚类为一个分支,羽叶丁香单独聚类为一个分支;不同的是组一级的分类在聚类图上显示不明显,短花冠管组的北京丁香和暴马丁香聚类到欧丁香系分支的内部。这说明该方法得到的聚类结果不支持该属植物2个组的划分,认为短花冠管组的种与欧丁香系的种亲缘关系比较接近;不同系之间的种聚类关系上有交叉现象,巧玲花系的关东丁香聚类于顶生花序系的内部,这说明巧玲花系与顶生花序系之间可能存在比较近的亲缘关系。

欧丁香系分支内部,花叶丁香与华丁香在遗传距离为0.292处聚类,什锦丁香与紫丁香在遗传距离为0.368处聚类。据记载,花叶丁香具有华丁香1/4的血统^[13],某些学者基于ITS序列分析认为什锦丁香与紫丁香组成姐妹类群^[3]。本试验得出的结论与前人研究结果一致。

女贞属的2个种聚类于丁香属植物的内部,位于羽叶丁香和小叶丁香之间,这说明本试验结果支持女贞属植物起源于丁香属植物内部的结论。

3 讨论

3.1 欧丁香品种之间的亲缘关系分析

据记载,目前欧丁香的栽培品种已经多达1500个,大多数欧丁香品种是通过人工选育得到的^[14]。本试验选取的欧丁香品种亲本不明,聚类结果显示多数品种聚类于欧丁香系分支内部,说明多数欧丁香品种为欧丁香系内部种或品种杂交选育而来;4个形态学上明显具有顶生花序系种类特点的的欧丁香品种与顶生花序系的种聚类为一个分支,据此推测,欧丁香系和顶生花序系之间存在着一定的基因交流,丁香属不同系之间的杂交是可以获得成功的,顶生花序系的加入丰富了欧丁香品种性状。

3.2 利用 AFLP 技术探讨丁香属的内部分支

以往的学者对该属植物内部分支关系的研究结

论是有争议的,传统分类法将该属植物划分为短花冠管组与长花冠管组,又将长花冠管组划分为欧丁香系、顶生花序系和巧玲花系与羽叶丁香系。Kim利用cpDNA的RFLP技术、秦祥堃利用同工酶技术的研究结果支持该属植物划分为2个组^[2,8];Li等通过研究rDNA的ITS与ETS认为应该去除组的划分,支持4个系的划分,并认为巧玲花系和顶生花序系具有比较近的亲缘关系,短花冠管组的种与巧玲系的种首先聚类^[3]。

本研究结果表明:该属植物组的划分不明显,短花冠管组的种与欧丁香系首先聚类,巧玲花系与顶生花序系首先聚类。这一结果与Li等^[3]人的研究结果比较一致,与Kim和秦的研究结果相差比较大;在长花冠管组内部,羽叶丁香单独聚类为一个分支与其他系并列,支持传统分类学羽叶丁香单独为一个系的结论。

3.3 丁香属植物与女贞属植物之间的亲缘关系

关于女贞属和丁香属的亲缘关系,目前学术界有2种不同的提法,何森^[15]根据形态学分析认为丁香属可能起源于女贞属,丁香属是一个单系类群,Li等^[3,16]研究rDNA的ITS与ETS结果与Eva等利用rps1和trnL-F序列分析认为女贞属起源于丁香属,丁香属是一个并系类群。本试验利用AFLP标记技术的聚类研究发现女贞属植物聚类于丁香属植物分支内部,从遗传距离角度来看,更支持女贞属起源于丁香属的观点,与后两者的研究结论一致。据此推测,女贞属的地位需要重新界定,进一步研究这2个属之间的关系和分类地位很有必要。

参 考 文 献

- [1] 明军,顾万春,刘春,等.丁香属植物种质资源研究概况[J].世界林业研究,2007,20(3):20-26
- [2] Ki-Joong Kim, Robert K Jansen. A Chloroplast DNA phylogeny of lilacs (*Syringa*, Oleaceae): Plastome groups show a strong correlation with crossing groups[J]. American Journal of Botany, 1998, 85(9): 1338-1351
- [3] Li J H, Alexander J H, Zhang D L. Paraphyletic *Syringa* (Oleaceae): evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ETS regions[J]. Systematic Botany, 2002, 27(3): 592-597
- [4] Chen X L, Chen Z F, Han J. Using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for lilac genetic analysis and classification in lilac cultivar[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin 1999, 19(2): 169-176

- [5] Pfosser M, Yemelyanova H, Leonhardt W. Identification of cultivars and hybrids in *Syringa* and *Cucurbita* by DNA fingerprinting[J]. Acta Hort (Ishs), 2000, 530:455-462
- [6] 明军, 顾万春. 紫丁香天然群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(6):1269-1274
- [7] 龚梅香. 巧玲花天然群体遗传多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2007
- [8] 秦祥堃. 木犀科系统研究中过氧化物同工酶的应用[J]. 云南植物研究, 1996, 18(2):159-166
- [9] 崔红霞, 蒋高明, 臧淑英. 丁香属植物的地理分布及其起源演化[J]. 植物研究, 2004, 24(4):141-145
- [10] 卓立环, 李艳萍. 丁香属植物分子系统学研究现状综述[J]. 牡丹江师范学院学报, 2005, 3:9-10
- [11] 邹俞苹, 葛颂. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- [12] Pieter Vos. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21):4407-4414
- [13] 张美珍, 邱莲卿. 中国植物志(第 61 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1992
- [14] 曾送君. 圣洁的欧洲丁香[J]. 花木盆景: 花卉园艺版, 2010(1):F0002-F0002
- [15] 何森, 卓丽环. 基于形态学性状的东北地区丁香属分支系统学分析[J]. 林业科技, 2007, 32(2):60-64
- [16] Eva Wallander. Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data[J]. American Journal of Botany, 2000, 87(12):1872-1841

(责任编辑: 王燕华)

欢迎订阅 2012 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种; 耕作栽培·生理生化; 植物保护; 土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境; 园艺; 园林; 贮藏·保鲜·加工; 畜牧·兽医等栏目。读者对象是国内外农业科研院(所)、农业大专院校的科研、教学人员。

《中国农业科学》中文版影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。1999年起连续 10 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 2001 年入选中国期刊方阵双高期刊; 1999 年获“首届国家期刊奖”, 2003、2005 年获“第二、三届全国国家期刊奖提名奖”; 2004—2006 年连续荣获第四、五届全国农业优秀期刊特等奖; 2002 年起 7 次被中信所授予“百种中国杰出学术期刊”称号; 2008 年获中国科技信息研究所“精品科技期刊”称号, 及武汉大学中国科学评价中心“权威期刊”称号; 2010 年荣获“第二届中国出版政府奖期刊提名奖”。在北京大学《中文核心期刊要目总览(2008 年版)》中位居“农业综合类核心期刊表”首位。2010 年 1 月起中文版改为半月刊, 将有更多最新农业科研成果通过《中国农业科学》及时报道。

《中国农业科学》英文版(Agricultural Sciences in China)2002 年创刊, 2006 年 1 月起正式与国际著名出版集团 Elsevier 合作, 海外发行由 Elsevier 全面代理, 全文数据在 Science Direct 平台面向世界发行。2010 年 1 月起英文版页码增至 160 页。2010 年 Agricultural Sciences in China 被 SCIE 收录, 拟于 2012 年 1 月更名为 Journal of Integrative Agriculture。

《中国农业科学》中文版大 16 开, 每月 1、16 日出版, 国内外公开发行。每期 224 页, 定价 49.50 元, 全年定价 1188.00 元, 国内统一刊号: CN11-1328/S, 国际标准刊号: ISSN0578-1752, 邮发代号: 2-138, 国外代号: BM43。

《中国农业科学》英文版大 16 开, 每月 20 日出版, 国内外公开发行。每期 160 页, 国内订价 36.00 元, 全年 432.00 元, 国内统一刊号: CN11-4720/S, 国际标准刊号: ISSN1671-2927, 邮发代号: 2-851, 国外代号: 1591M。

邮编: 100081 地址: 北京 中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

电话: 010-82109808, 82106280, 82106281, 82106282 传真: 010-82106247

网址: www.ChinaAgriSci.com E-mail: zgnykx@mail.caas.net.cn