

ITS, *rps16* and *trnL-F* Sequence Analysis and Genetic Relationships of *Allium macrostemon* from Different Regions in China

Tian Shi, Zhongmei Mo, Min Wu, Cai Zhao*

College of Life Sciences, Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang Guizhou
Email: zhaocai_@163.com

Received: Jun. 5th, 2020; accepted: Jun. 26th, 2020; published: Jul. 3rd, 2020

Abstract

40 *Allium macrostemon* Bunge individuals from different regions in China were used as materials to explore the genetic relationship. Their sequences of ITS, *rps16* and *trnL-F* were amplified and sequenced respectively, and their sequence characteristics and genetic relationship were analyzed. Results showed that the average length of ITS, *rps16* and *trnL-F* sequences was 590 bp, 587 bp and 622 bp respectively; the average content of G + C was 50.64%, 29.66% and 38.16% respectively. Based on ITS + *rps16* + *trnL-F* sequence structure, the maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) phylogenetic trees show that *A. macrostemon* is a monophyletic species, which can be generally divided into A group in Southwest China, B group in coastal area and C group in North and Northeast China. Research suggested that the populations with close genetic relationships and geographical location were also close, which indicated that ITS + *rps16* + *trnL-F* sequence could be used in the study of genetic relationship of *A. macrostemon* from different habitats. Based on ITS + *rps16* + *trnL-F* sequence of *A. macrostemon*, resources from different habitats to construct phylogenetic tree could provide the genetic map and some scientific data for the development, protection, utilization and breeding of *A. macrostemon* resources.

Keywords

Allium macrostemon Bunge, ITS, *rps16*, *trnL-F*, Relationship

中国不同产地薤白ITS、*rps16*和*trnL-F*序列分析及亲缘关系分析

石甜, 莫忠妹, 吴敏, 赵财*

*通讯作者。

贵州大学生命科学学院, 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 贵州 贵阳
Email: zhaocai_@163.com

收稿日期: 2020年6月5日; 录用日期: 2020年6月26日; 发布日期: 2020年7月3日

摘要

本文为探讨不同产地薤白(*Allium macrostemon* Bunge)的亲缘关系,以40个来自我国不同产地的薤白为材料,分别以ITS、*rps16*及*trnL-F*序列进行扩增并测序,分析其序列特征及亲缘关系。结果显示:我国不同产地薤白ITS序列平均长度为590 bp, G + C平均含量为50.64%; *rps16*序列平均长度为587 bp, G + C平均含量为29.66%; *trnL-F*序列平均长度为622 bp, G + C平均含量为38.16%。基于ITS + *rps16* + *trnL-F*联合序列构的最大简约法(maximum parsimony, MP)和贝叶斯(Bayesian inference, BI)系统发育树均表明,薤白为一单系种,总体可划分为位于西南地区的A组、沿海地区的B组和北方及东北的C组。研究表明,亲缘关系较近的居群,地理位置也较近,说明ITS + *rps16* + *trnL-F*联合序列可用于不同产地薤白的亲缘关系研究中,可以提供亲缘关系图谱,为薤白资源的开发、保护、利用及育种提供一定的科学资料。

关键词

薤白, ITS, *rps16*, *trnL-F*, 亲缘关系

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

薤白(*Allium macrostemon* Bunge)为多年生草本植物,隶属石蒜科(*Amaryllidaceae*)葱属(*Allium*),又称为小根蒜,其鳞茎可作蔬菜食用,也可作药用。广泛分布于东亚地区,在我国除新疆青海外,各省均有分布。薤白具有降脂、抗氧化及抗癌等功能,是一种非常具有开发价值的药物[1]。

随着分子生物学技术的飞速发展,对特定的DNA序列进行PCR扩增并进行测序成为分析植物亲缘关系的一种技术。核糖体DNA(nrDNA)内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)一般以高度串联重复的方式分布于高等植物的基因组中,具有变异速率高、序列长度保守、片段较小、易扩增及易分析等特点[2][3]。叶绿体DNA(cpDNA)为单亲遗传,序列保守性较高,进化速率恒定[4]。ITS、*rps16*和*trnL-F*序列进化速率较快,遗传变异相对较高,适用于亲缘关系分析中[5][6]。黄德青等[7]利用ITS和*trnL-F*序列对薤白的系统地位和分类等级进行了探讨,认为薤白为一单系种;莫忠妹等[8]采用ITS序列进行西南地区薤白的亲缘关系及地理分布格局研究,结果表明ITS序列可以鉴定不同地区薤白的亲缘关系。但中国地势西高东低,大致呈阶梯状分布,自然环境存在较大差异,因此在扩大研究居群的基础上探讨全国不同地区薤白的亲缘关系的研究值得开展。本研究首次采集中国整个分布区域的40个不同薤白居群,利用ITS、*rps16*和*trnL-F*序列进行测序,分析其序列特征及全国不同产地薤白的亲缘关系,为薤白植物资源的开发、保护、利用及育种提供一定理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

供试薹白共包含 40 个不同产地的自然居群, 各居群均采集 10~15 个个体(表 1)。野外采集薹白的新鲜叶片后立即用变色硅胶干燥, 保存用于总 DNA 提取。参考黄德青等[7]研究选取用于本研究的葱属植物, 其序列来自 GenBank (表 2)。

2.2. DNA 提取、扩增及测序

采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取薹白总 DNA。ITS、*rps16*、*trnL-F* 序列扩增引物及扩增程序分别参照 Wendel 等[9]、Oxelman 等[10]和 Taberlet 等[11]设计的引物及扩增程序(表 3), 引物均由重庆擎科兴业生物技术有限公司合成。将琼脂糖凝胶电泳检测结果符合标准的产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化及单向测序。

Table 1. Information table of *A. macrostemon* from different producing areas
表 1. 不同产地薹白信息表

样品编号	采集地	样品编号	采集地
AHCZ	安徽省池州市	JSNJ	江苏省南京市
CQSZ	重庆市石柱土家族自治县	JXJA	江西省吉安市
CQWX	重庆市巫溪县	JXSR	江西省上饶市
DPS	浙江省大盘山	LNDD	辽宁省丹东市
FJFZ	福建省福州市	MDJ	黑龙江省牡丹江市
GDGZ	广东省广州市	NMG	内蒙古自治区鄂尔多斯市
GSLN	甘肃省陇南市	NXYC	宁夏回族自治区银川市
GSTS	甘肃省天水市	SCJG	四川省广元市剑阁县
GXGL	广西壮族自治区桂林市	SCLS	四川省凉山彝族自治州
GZXW	贵州省贵阳市修文县	SCYA	四川省雅安市
HBHS	湖北省黄石市	SDQD	山东省青岛市
HBTS	河北省唐山市	SDZB	山东省淄博市
HLD	辽宁省葫芦岛市	SHFX	上海市奉贤区
HLJSH	黑龙江省绥化市	SXXA	陕西省西安市
HNHH	湖南省怀化市	SXYC	山西省运城市
HNNY	河南省南阳市	YCXX	山西省运城市夏县
HNSY	湖南省邵阳市	YNWS	云南省文山壮族苗族自治州
HNXY	河南省信阳市	YNYX	云南省玉溪市
JLBS	吉林省白山市	YNZT	云南省昭通市
JLTH	吉林省通化市	ZJWZ	浙江省温州市

Table 2. ITS, *rps16* and *trnL-F* sequence information of *Allium* download from NCBI
表 2. NCBI 下载的葱属的 ITS、*rps16* 及 *trnL-F* 序列信息

物种	GenBank 序列号		
	ITS	<i>rps16</i>	<i>trnL-F</i>
棱叶韭 <i>Allium caeruleum</i> Pall.	MG772547	GU566645	KF693263
野韭 <i>Allium ramosum</i> Linn.	HQ690285	HE774710	KF143839
合被韭 <i>Allium tubiflorum</i> Rendle	GU566622	MG709296	KF143837
北韭 <i>Allium lineare</i> Linn.	GQ181103	GU566629	KF693274
多星韭 <i>Allium wallichii</i> Kunth	HF934358	HF934473	KF550178
韭 <i>Allium tuberosum</i> Rottl.	HE774705	GU566662	KC139048
镰叶韭 <i>Allium carolinianum</i> DC.	AJ250290	GU566627	GU570982
黄花葱 <i>Allium condensatum</i> Turcz.	HQ690573	GU566643	JF262660
宽叶韭 <i>Allium hookeri</i> Thwaites	KT762155	JX017639	KF550163
长梗韭 <i>Allium neriniflorum</i> (Herb.)	AJ411913	KP207738	JF262642
单花韭 <i>Allium monanthum</i> Maxim.	AJ412745	HF934413	KF550166

Table 3. Primer and protocols of PCR
表 3. PCR 引物信息及反应程序

引物名称	引物序列	反应程序
ITS	F: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG R: TCCTCCTCCGCTTATTGATATGC	94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min; 55.6℃ 退火 45 s; 72℃ 延伸 1 min, 共 36 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。
<i>trnL-F</i>	F: ATTTGAACTGGTGACACGAG R: CGAAATCGGTAGACGCTACG	95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 45 s; 52℃ 退火 45 s; 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。
<i>rps16</i>	F: GTGGTAGAAAAGCAACGTGCGACTT R: TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	95℃ 预变性 4 min; 35 × (95℃ 变性 30 s; 53.4℃ 退火 1 min; 72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。

2.3. 数据分析

测序所得数据采用 Chromas 软件查看序列峰图, 利用 DNASTar 软件、MEGA7.0 软件和 PhyloSuite 软件进行序列编辑和组装, 校正错误碱基并对序列进行对位排序, 去除引物区后对所得序列进行拼接[12][13]。用最大简约法(Maximum parsimony, MP)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)进行系统发育分析并构建进化树。最大简约法中用自展值(Bootstrap value, BS)来检验系统发育树的可靠性[14]。使用 MrBayes 3.2.1 进行贝叶斯推理法分析, 利用 ITS + *rps16* + *trnL-F* 联合序列构建的系统发育树。用后验概率(Posterior probability, PP)表示分支可信度。

3. 结果与分析

3.1. ITS、*rps16*、*trnL-F* 序列分析

本研究薤白的 ITS、*rps16* 及 *trnL-F* 序列均存在一定程度的变异(表 4), 包括 A-C、A-T、G-C、G-T 间的碱基颠换及 A-G、C-T 间的碱基转换。包含由此可见, 不同产区的薤白 nrDNA 和 cpDNA 序列均表现出一定的变异。

Table 4. Information of ITS、*rps16* and *trnL-F*
表 4. ITS、*rps16* 及 *trnL-F* 序列信息

序列名称	平均长度(bp)	平均 GC 含量(%)	变异位点	简约信息位点
ITS	590	50.64	342	223
<i>rps16</i>	587	29.66	4	2
<i>trnL-F</i>	622	38.16	12	7

3.2. 薤白的亲缘关系分析

参考黄德青等[7]以单花韭(*Allium monanthum* Maxim.)为外类群,构建系统发育树(图 1)。结果显示,中国地区的薤白单独聚为 I 组,其他葱属植物聚为 II 组,说明薤白为一单系种。第 I 组可分为位于中国西南地区的 A 组,如 GZXW、SCJG、YNZT、SCLS、CQWX 等地;位于中国沿海地区的 B 组,如 GDGZ、DPS、SHFX、SDQD、LNDD 等地;位于中国北方及东北地区的 C 组,如 GSLN、YCXX、NMG、MDJ 等地。II 组中的 *A. wallichii* Kunth 与 *A. hookeri* Thwaites 聚为一支(PP = 1, BS = 99); *A. neriniflorum* Herb. 与 *A. tubiflorum* Rendle 聚为一支(PP = 1, BS = 100); *A. ramosum* L. 与 *A. tuberosum* Rottl. 聚为一支(PP = 1, BS = 100)。此外,II 组中的 *A. caeruleum* Pall. 与薤白为一并系(PP = 1, BS = 100),表明其相较于本研究所用的其他葱属植物与薤白亲缘关系较近。

4. 讨论

4.1. 序列特征

本研究中,中国不同产地薤白的 ITS 序列 G + C 平均含量为 50.64%,包含 342 个变异位点;*rps16* 序列 G + C 平均含量为 29.66%,包含 4 个变异位点,存在于少数几条序列上;*trnL-F* 序列 G + C 平均含量为 38.16%,包含 12 个变异位点,同样存在于少数序列上。综上所述,*rps16* 和 *trnL-F* 序列变异很小,信息位点不多,而薤白 ITS 序列含有丰富的变异位点和简约信息位点,说明 ITS 序列在中国地区的薤白中存在丰富的遗传变异,相比较而言,*rps16* 与 *trnL-F* 序列的变异位点以及简约信息位点低于 ITS 序列,这与赵海光等[15]、陈仁芳等[16]及唐萍和彭程[17]的研究结果一致,体现了 nrDNA ITS 和 cpDNA *rps16* 与 *trnL-F* 序列在亲缘关系鉴定中的不同水平。使用 ITS + *rps16* + *trnL-F* 联合序列能增加树长,提高信息位点,使拓扑结构更具有客观性,能较好的解决不同产区薤白的亲缘关系,可以为不同地区薤白的分类鉴定提供依据,具有一定指导意义。

4.2. 中国不同产地薤白的亲缘关系

中国地形地势西高东低,地形多种多样,地貌类型复杂多样。从西部的大高原,到中部的盆地,再到东部平原,自西向东呈阶梯状逐级下降的地势特点十分明显,自然环境存在较大的差异。本研究中,基于 ITS、*rps16* 与 *trnL-F* 联合序列构建的系统发育树,结果显示薤白与其它葱属植物区分开,单独聚为一支,支持将薤白作为独立的单系群。基于联合序列构建的系统发育树能够将 40 个不同来源的薤白划分为 A (西南地区)、B (沿海地区)、C (北方及东北地区)三组。结合不同产地的地理位置来看,不同产地薤白的亲缘关系与其地理位置有关,如 A 组中包含的贵州修文、四川剑阁、云南昭通等地位于中国西南地区,该地区受青藏高原、云贵高原及四川盆地的影响,在地形地貌及气候环境方面表现出独特性;B 组中包含的广东广州、浙江大盘山山东青岛等地为东部沿海地区,该地区受亚热带季风气候和温带季风气候的影响,降雨量高于内陆地区;C 组甘肃陇南、山西运城夏县、内蒙古等地位于中国北方及东北地区,

该地区地形以平原为主，也有高原和山地，温带季风气候，四季分明。综上，不同薤白亲缘关系近，其地理位置也较近，这一结论与 Chen 等[18]、王谈笑等[19]和腰政懋等[20]研究结果一致。

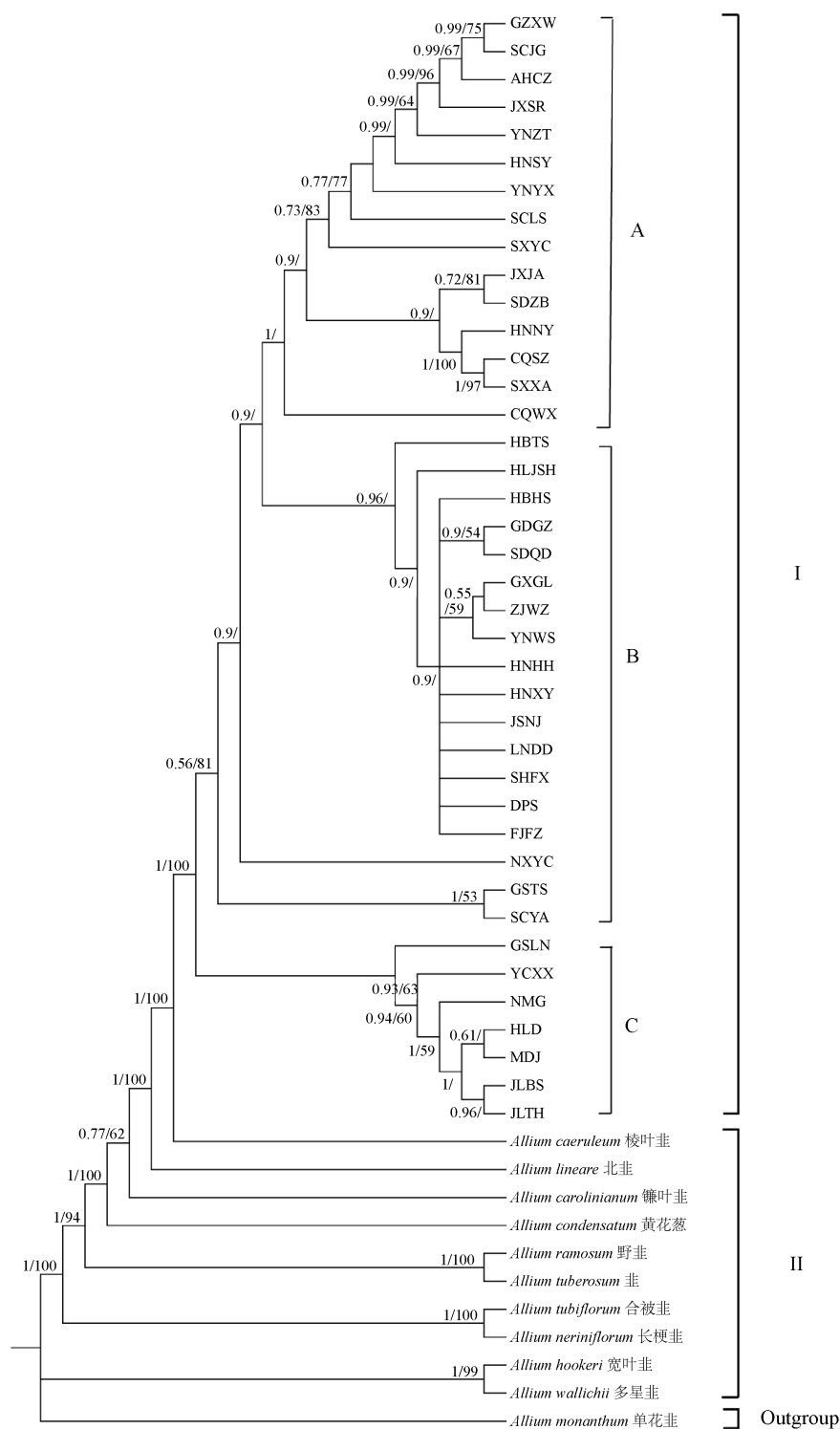


Figure 1. Phylogenetic tree based on ITS + rps16 + trnL-F sequence

图 1. 基于 ITS + rps16 + trnL-F 联合序列构建的系统发育树

因此, 推测导致中国地区薤白总体分成三个方向的因素可能是我国各地区的气候条件及地势地貌等因素: (1) 薤白自身的环境耐受力 and 扩散能力[21]; (2) 第四纪青藏高原强烈抬升而激发了东亚季风, 使我国的植物区系经向分带更加明显[22] [23]; (3) 山川与河流分布[24]; (4) 海拔差异显著, 引起植物区系分化或特化, 居群的分化受到地理隔离的影响[25]。本研究利用的 ITS + *rps16* + *trnL-F* 联合序列可用于薤白及其近缘种的种间鉴别及亲缘关系研究, 可提供亲缘关系图谱, 为薤白不同产地的亲缘关系以及后续薤白资源的开发、保护、利用及育种奠定理论基础。

致 谢

感谢贵州省生物学国内一流建设学科开放基金(No. GNYL[2017]009)和贵州省中药材现代产业技术体系建设(No. GZCYTX-02)的资助。感谢本论文所引用专著各位学者。

基金项目

贵州省生物学国内一流建设学科开放基金(No. GNYL[2017]009)和贵州省中药材现代产业技术体系建设(No. GZCYTX-02)。

参考文献

- [1] 熊朝勇, 陈霞. 药食同源野生蔬菜小根蒜研究进展[J]. 现代食品, 2019(20): 103-105.
- [2] 任梦云, 杜乐山, 陈彦君, 张盾, 沈奇, 关潇, 张银东. 锁阳 ITS 序列遗传多样性分析[J]. 植物学报, 2018, 53(3): 313-321.
- [3] 宋荣, 宋静爽, 欧立军, 严蓓, 周佳民, 朱校奇, 易自立. 不同地区多花黄精的 ITS 序列分析及近缘种聚类分析[EB/OL]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20191216.1111.004.html>, 2020-06-05.
- [4] Downie, S.R. and Katz-Downie, D.S. (1999) Phylogenetic Analysis of Chloroplast *rps16* Intron Sequences Reveals Relationships within the Woody Southern African Apiaceae Subfamily Apioideae. *Canadian Journal of Botany*, **77**, 1120-1135. <https://doi.org/10.1139/b99-086>
- [5] 胡颖, 王茜, 张新新, 等. 叶绿体 DNA 标记在谱系地理学中的应用研究进展[J]. 生物多样性, 2019, 27(2): 219-234.
- [6] 章秋平, 马小雪, 魏潇, 刘威生, 董文轩, 刘宁, 张玉萍, 徐铭, 刘硕, 张玉君. 基于叶绿体 DNA 序列 *trnL-F* 分析李亚属植物的系统发育关系[J]. 果树学报, 2017, 34(10): 1249-1257.
- [7] 黄德青, 李琴琴, 周颂东, 何兴金. 基于 nrDNA ITS 和 cpDNA *trnL-F* 序列探讨薤白的系统地位[J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(5): 537-545.
- [8] 莫忠妹, 成宇, 石甜, 赵财. 基于 ITS 序列西南地区不同居群薤白亲缘关系及其地理分布格局研究[J]. 西北植物学报, 2019, 39(9): 1573-1580.
- [9] Wendel, J.F., Schnabel, A. and Seelanan, T. (1995) Bidirectional Interlocus Concerted Evolution Following Allopolyploid Speciation in Cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 280-284. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.280>
- [10] Oxelman, B., Magnus, L. and Berglund, D. (1997) Chloroplast *rps16* Intron Phylogeny of the tribe *Sileneae* (*Caryophyllaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, **206**, 393-410. <https://doi.org/10.1007/BF00987959>
- [11] Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. (1991) Universal Primers for Amplification of Three Non-Coding Regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105-1109. <https://doi.org/10.1007/BF00037152>
- [12] Burland, T.G. (2000) DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software. *Methods in Molecular Biology*, **132**, 71-91. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:71>
- [13] Sudhir, K., Glen, S. and Koichiro, T. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**, 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- [14] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- [15] 赵海光, 周建建, 曹珊珊, 郑玉红, 单宇, 夏冰. 基于 ITS 和 *trnL-F* 序列碱基差异的繁缕及其近缘种的亲缘关系

- 分析[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(1): 1-5.
- [16] 陈仁芳, 张泽, 唐洲, 余茂德, 徐立, 王茜玲. 桑属 ITS、trnL-F、rps16 序列与进化分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1553-1561.
- [17] 唐萍, 彭程. 叶绿体基因组进化的速率和方式[J]. 生物学通报, 2010, 45(6): 8-10.
- [18] Chen, J.M., Zhao, S.Y., Liao, Y.Y., Gichira, A.W., Gituru, R.W. and Wang, Q.F. (2015) Chloroplast DNA Phylogeographic Analysis Reveals Significant Spatial Genetic Structure of the Relictual Tree *Davidia involucrata* (Davidiaceae). *Conservation Genetics*, **16**, 583-593. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0683-z>
- [19] 王谈笑, 郑伟, 陈菁, 王炜, 徐晓丹. 基于 ITS 序列分析钩苞大丁草九个居群的亲缘关系[J]. 广西植物, 2017, 37(3): 329-334.
- [20] 腰政懋, 徐程扬, 李乐. 不同种源辽东冷杉 rDNA ITS 序列及其亲缘关系[J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(10): 6-9, 13.
- [21] 袁娟娟, 叶瑱, 卜文俊. 欧亚大陆广布物种的谱系地理研究:现状与发展趋势[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(9): 1155-1164.
- [22] 金建华, 廖文波, 王伯荪, 彭少麟. 新生代全球变化与中国古植物区系的演变[J]. 广西植物, 2003, 23(3): 217-225.
- [23] 萧家仪, 商志远, 舒强, 尹建吉, 吴小爽. 中国南方内陆山地末次冰盛期植被特征及古环境意义[J]. 中国科学: 地球科学, 2018, 48(5): 651-660.
- [24] 张晓芸. 青藏高原及邻近地区河谷植物小蓝雪花的谱系地理学研究[D]: [硕士学位论文]. 昆明: 云南师范大学生命科学学院, 2017.
- [25] 冯建孟, 朱有勇. 滇西北地区种子植物地理分布及区系分化[J]. 西北植物学报, 2009, 29(11): 2312-2317.