

基于叶绿体DNA *atpB-rbcL*区序列探讨石蒜属种间系统发育关系

魏磊¹, 庞磊¹, 杨旭², 史树德^{1*}

(1. 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010018; 2. 中国林科院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 为了探讨石蒜属(*Lycoris* Herb.)植物的种间系统发育关系,对石蒜属植物95份材料,包括15种4变种及2个人工杂种的叶绿体DNA *atpB-rbcL* 间隔区进行了测序,结合花部形态和核型特征,探讨了石蒜属种间系统关系及其可能的杂交起源。系统发育树的分析结果表明,矮小石蒜(*L. radiata* var. *pumila*)和换锦花(*L. sprengeri*)与2个人工杂交种、麦秆石蒜(*L. straminea*)、江苏石蒜(*L. houdyshelii*)、短蕊石蒜(*L. caldwellii*)和乳白石蒜(*L. albiflora*)具有密切的亲缘关系。*atpB-rbcL* 序列揭示的石蒜属种间关系与染色体核型的分类结果部分一致,主要表现在具有近端部着丝粒(A)染色体的种与具有中部(M)和端部(T)着丝粒染色体的种各成一支,与形态和染色体分类结果一致;不同之处在于具有中部、端部和近端部着丝粒染色体的种分散在两个主要分支内,进一步验证了具有中部、端部和近端部3种着丝粒类型染色体组的石蒜,如麦秆石蒜、江苏石蒜、短蕊石蒜和乳白石蒜等,是杂交起源的假设,结合2个人工杂交种分析,揭示了短蕊石蒜和乳白石蒜的近端部着丝粒染色体来源于换锦花;麦秆石蒜和江苏石蒜近端部着丝粒染色体来源于矮小石蒜。

关键词: 石蒜属; 叶绿体 *atpB-rbcL* 序列; 种间系统发育关系; 杂交起源; 系统发育树

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.02.002

Investigation on the Phylogenetic Relationships of *Lycoris* (Amaryllidaceae) Based on Chloroplast *atpB-rbcL* Sequences

WEI Lei¹, PANG Lei¹, YANG Xu², SHI Shu-de^{1*}

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China; 2. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry Sciences, Fuyang 311400, China)

Abstract: In order to understand the phylogenetic relationships in genus *Lycoris*, the *atpB-rbcL* spacer regions of chloroplast DNA (cpDNA) were sequenced from selected 95 taxa, including 15 species, 4 varieties and 2 hybrids. The results showed that 95 taxa were clearly classified into two main clades from phylogenetic tree based on *atpB-rbcL* sequences. There were close relationship among *L. radiata* var. *pumila*, *L. sprengeri*, *L. caldwellii*, *L. albiflora*, *L. straminea* and *L. houdyshelii*. The interspecific relationship revealed by *atpB-rbcL* sequences is partially consistent with morphological and karyotype classification. The species with subtelocentric chromosome grouped Clade I, and the species with telocentric and metacentric chromosomes formed Clade II. The species with subtelocentric, telocentric and metacentric chromosomes dispersed in the two clades, it verified the hypothesis that *Lycoris* species with subtelocentric, telocentric and metacentric chromosomes were hybrid origin. Combining the data from two artificial hybrids, *atpB-rbcL* sequence analysis also revealed that subtelocentric chromosomes of *L. albiflora* and *L. caldwellii* derived from *L. sprengeri*, while those of *L. houdyshelii* and *L. straminea* from *L.*

收稿日期: 2012-04-17 接受日期: 2012-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960059)资助

作者简介: 魏磊,男,硕士,实验师,从事设施和观赏园艺方向的研究。E-mail: weilei@imau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Lycoris@imau.edu.cn

radiata var. *pumila*.

Key word: *Lycoris*; Chloroplast *atpB-rbcL* sequences; Interspecific relationship; Hybrid origin; Phylogenetic tree

石蒜属(*Lycoris*)是石蒜科(Amaryllidaceae)中一类具鳞茎的多年生草本植物,全世界有 20 多种,我国有 15 种 1 变种, 10 种为中国特有^[1],主要分布在我国长江以南的浙江、安徽和江苏 3 省,邻近各省零星分布有 2~3 种,日本、韩国、老挝和缅甸也各有 1~2 种,我国华东地区是该属植物的分布中心和演化中心^[2]。石蒜属植物是我国较少能在夏秋开花的重要观赏花卉之一,其花色绚丽多彩且形态优雅别致,是优良的切花、盆花和地被植物,是极具开发前景的观赏花卉资源;同时又是一种珍贵的药用植物,其鳞茎含有丰富的生物碱,从鳞茎中提取的加兰他敏是治疗老年痴呆症的特效药物之一。然而石蒜属内自然杂交频繁,形态上存在连续的变异类型,仅凭形态特征难以对其分类和亲缘关系进行正确判断。该属植物的染色体具多型性且变异频繁,存在二倍体、三倍体、多倍体和非整倍体^[3-5],因而也是遗传学和进化生物学的理想材料。虽然染色体资料在石蒜杂交复合体的分类上有重要意义^[6],但由于核型分析在对该属植物种的界定上分辨率不高,所以在对该属分类鉴定上仍很困难。因此寻找一种更有效的鉴定分类方法以澄清该属植物的种间系统发育关系,不仅对该属植物的开发利用及保护有重大意义,同时也为阐明该属植物的染色体进化和物种形成奠定基础。

传统的系统发育分析主要依赖于物种的生物学特性、生物形态及生物地理信息等,但物种间可供比较的形态学性状是有限的,同时由于进化趋同,不同物种可能表现出相同的形态特征,近年来 DNA 序列分析已成为研究物种分类鉴定和种间系统进化关系问题的重要方法之一。等位酶、同工酶、RAPDs、AFLP 等分子标记技术已经应用于部分石蒜属的种间关系研究^[7-11],但是这些分子标记都是 DNA 序列信息的间接反映,直接来自 DNA 序列的证据在揭示植物系统发育关系上具有更大优势^[12-15]。袁菊红等^[6]和全妙华等^[17]基于叶绿体 DNA 序列分析了石蒜属的部分种间关系,初步揭示了石蒜属部分种可能的杂交起源,但由于取材不全,没有在居群水平上进行杂交起源的探讨,所以其结果缺乏可比性。为此,本研究利用叶绿体 DNA *atpB-rbcL* 序列,在全面收集并鉴定石蒜属植

物的基础上,结合具有确切亲本的人工杂交种作为参考,系统全面地分析和揭示石蒜属植物的种间系统发育关系,并探讨该属植物可能的杂交起源。

1 材料和方法

1.1 材料

共收集 95 份石蒜属(*Lycoris*)植物材料,包括 15 种 4 变种及 2 个人工杂种^[18],野外采集的材料取鳞茎栽培于浙江大学植物园内,取样的叶片用硅胶干燥保存(表 1)。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

实验材料均为硅胶干燥的叶片, DNA 提取采用改进的 CTAB 法^[19],按照 Wizard Genomic DNA Purification System 基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega)纯化。*atpB-rbcL* 区的扩增引物为 *atpB* (5'-ACATCKARTACKGGACCAATAA-3')和 *rbcL* (5'-AACACCAGCTTTTRAATCCAA-3')^[20]。50 μ L 反应体系包含:20 ng 的 DNA 模板, 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 2.5 U *Taq* 聚合酶(5 U μ L⁻¹, 上海生工), 1 μ L dNTP (10 mmol L⁻¹ each, 上海生工), 1 μ L primer⁻¹ (10 μ mol L⁻¹, 上海生工合成),用双蒸水补齐。扩增反应在 Perkin-Elmer Programmable Thermalcycler (Gene Amp. 9600)上进行。扩增程序为:首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 35 个循环。循环结束后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。PCR 扩增产物用 Qiagen 公司的 QIAquick PCR Purification Kit 纯化后测序,测序反应在 ABI377 测序仪上进行,使用 BigDye Terminator 试剂盒进行 DNA 序列测定。

1.3 DNA 序列分析

序列排列用 Sequencher 4.0.5 (Gene Codes Corp. Ann. Arbor. MI) 处理,并辅以手工校正。序列分析使用 PAUP 4.0b10^[21]的最大简约法(Maximum parsimony, MP)和邻接法(Neighbor-joining, NJ),选择 K-2-P 参数^[22]。以文殊兰属 *Crinum asiaticum* 和 *C. angustum* 为外类群构建 *atpB-rbcL* 序列的系统发育树。

表 1 供试材料信息

Table 1 Information of plant materials

植物 Species	采集地 Location	凭证标本 Voucher	典型核型 Karyotype	GenBank 登录号 GenBank No.
中国石蒜 <i>Lycoris chinensis</i> Traub	浙江莫干山 Mogan Shan, Zhejiang,	F20010801	6M + 10T	DQ020502
	湖南张家界 Zhangjiajie, Hunan	S20091001		
	浙江天目山 Tianmu Shan, Zhejiang	F20010809		
	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	F20010816		
长筒石蒜 <i>L. longituba</i> Y. Hsu & G. J. Fan	安徽琅琊山 Langya Mountain, Anhu	S20030809	6M + 10T	DQ020510
	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S20020906		
	南京中山植物园 Zhongshan Bot. Gard.	S20030817		
黄长筒石蒜 <i>L. longituba</i> var. <i>flava</i> Y. Hsu & G. J. Fan	安徽琅琊山 Langya Mountain, Anhui	S200308010	6M + 10T	DQ020509
	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200409002		
忽地笑 <i>L. aurea</i> (L'Hérit) Herb.	广西都安 Du'an, Guangxi	S200308011	6M + 10T	DQ020500
	四川成都 Chengdu, Sichuan	S200910004		
	湖南张家界 Zhangjiajie, Hunan	S200910204		
	浙江莫干山 Mogan Shan, Zhejiang	S200910105		
安徽石蒜 <i>L. anhuiensis</i> Y. Hsu & G. J. Fan	安徽琅琊山 Langya Mountain, Anhui	S200308013	6M + 10T	DQ020499
	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200408029		
换锦花 <i>L. sprengeri</i> Comes ex Baler	浙江普陀山 Putuo Shan, Zhejiang	F20010802	22A	DQ020516
	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200408023		
矮小石蒜 <i>L. radiata</i> var. <i>pumila</i> Grey	杭州飞来峰 Feilaifeng, Hangzhou	F20010803	22A	DQ020513
	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200406003		
二倍体石蒜 <i>L. radiata</i> var. <i>radiata</i> (L'Hérit) Herb.	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200308049	22A	DQ020511
	安徽黄山、芜湖 Huangshan and Wuhu, Anhui	S20030804		
		S20030805		
三倍体石蒜 <i>L. radiata</i> var. <i>radiata</i> (L'Hérit) Herb.	浙江天目山 Tianmu Shan, Zhejiang	S20090911	33A	DQ020512
	安徽宣城 Xuancheng, Anhui	S200308015		
	云南大理 Dali, Yunnan	S20090912		
红蓝石蒜 <i>L. × haywardii</i> Traub	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S20030807	22A	DQ020506
玫瑰石蒜 <i>L. × rosea</i> Traub & Moldenke	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200308011	22A	DQ020514
麦秆石蒜 <i>L. straminea</i> Lindley	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200408030	3M + 5T + 11A	DQ020518
	浙江莫干山 Mogan Shan, Zhejiang	S200308018		
鹿葱 <i>L. squamigera</i> Maximowicz	浙江普陀山 Putuo Shan, Zhejiang	S2003080190	6M + 10T + 11A	DQ020517
江苏石蒜 <i>L. × houdyshelii</i> Traub	江苏宜兴 Yixing, Jiangsu	S200308020	3M + 5T + 22A	DQ020507
	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200408010		
血石蒜 <i>L. sanguinea</i> var. <i>sanguinea</i> Maximowicz	Mt. Tara, Nagasaki Prefecture, Japan	KJ2004101	22A	DQ020515
短蕊石蒜 <i>L. caldwellii</i> Tarub	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200308021	6M + 10T + 11A	DQ020501
乳白石蒜 <i>L. albiflora</i> Koidzumi	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200408017	3M + 5T + 11A	DQ020498
	浙江天目山 Tianmu Shan, Zhejiang	S200408019		
	浙江莫干山 Mogan Shan, Zhejiang	S200408023		
黄花石蒜 <i>L. flavescens</i> M. Kim & S. Lee	Mt. Naejang-san, Korea	K2004101	3M + 4T + 11A + 1sm	DQ020505
杂交种 1 Hybrid 1 (<i>L. chinensis</i> × <i>L. radiata</i> var. <i>pumila</i>)	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200308024	3M + 5T + 11A	DQ020503
杂交种 2 Hybrid 2 (<i>L. chinensis</i> × <i>L. sprengeri</i>)	杭州植物园 Hangzhou Bot. Gard.	S200308023	6M + 10T + 11A	DQ020504

2 结果

石蒜属植物的 *atpB-rbcL* 区序列长度为 940 ~ 983 bp。95 份材料的 *atpB-rbcL* 区序列联配后的总长度为 983 bp, 其中 256 个位点为变异位点, 161 个位点具有系统发育信息, 信息位点数目占 *atpB-rbcL* 序列总长度的 16.9%。用两种常用的系统发育分析方法(MP 和 NJ)分别构建了石蒜属植物的系统发育树, 两种方法所获得的系统发育树在拓扑结构上基本一致, 仅在自展支持率上略有差异, 两种分析方法均表明石蒜属植物构成 1 个单系类群。MP 分析时 Gap 均作为缺失处理, 用启发式(Heuristic)搜寻, 结果共有 4 棵步长为 390 的最大简约树, 计算得到严格一致树。由于篇幅原因本文仅列出由 MP 方法获得的严格一致树(CI = 0.83; RI = 0.93, 图 1)。在最大简约法分析中, 所有供试材料构成一个自展支持率(BS)很高的单系群(BS = 100%), 这一高支持率的单系群又分为两个支持率很高的单系分

支(98%、96%)。第一单系分支包含 3 个分支, 其中第一个分支中的杂种 2、短蕊石蒜(*L. caldwellii*)、乳白石蒜(*L. albiflora*)和换锦花(*L. sprengeri*)组成 1 个姐妹群(BS = 89%); 红蓝石蒜(*L. haywardii*)和玫瑰石蒜(*L. rosea*)构成 1 个小的分支(BS = 86%); 第二个分支中的黄花石蒜(*L. flavescens*)和血石蒜(*L. sanguinea* var. *sanguinea*)关系最近(BS = 98%), 它们与二倍体石蒜(*L. radiata* var. *radiata*)和三倍体石蒜组成并系类群(BS = 100%); 第三个分支中的杂种 1、麦秆石蒜(*L. straminea*)和江苏石蒜(*L. houdyshelii*)构成一个小的分支(BS = 89%), 再与矮小石蒜(*L. radiata* var. *pumila*)聚为一支(BS = 96%)。另外, 香石蒜(*L. incarnata*)、长筒石蒜(*L. longituba*)和鹿葱(*L. squamigera*)聚为一支(BS = 99%), 并与安徽石蒜(*L. anhuiensis*)和长筒石蒜(*L. longituba* var. *flava*)组成姐妹群(BS = 100%), 再与中国石蒜(*L. chinensis*)和忽地笑(*L. aurea*)聚合为第二单系分支(BS = 96%)。

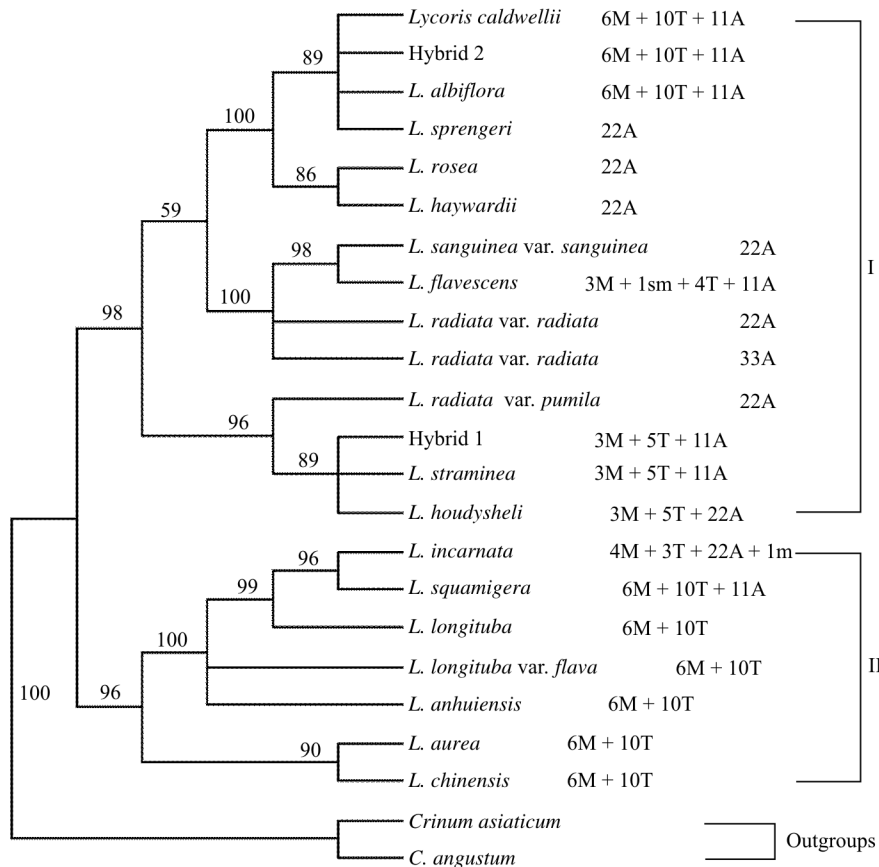


图 1 基于叶绿体 *atpB-rbcL* 序列用 PAUP 分析软件构建的石蒜属最简约严格一致树。各分支上的数值为 Bootstrap 值(1000 次重复抽样分析)。Fig. 1 Strict consensus tree based on chloroplast *atpB-rbcL* sequences of *Lycoris* using maximum parsimony analysis. Bootstrap values (1000 replicates) are shown above branches.

3 讨论

Kuria 和 Hsu^[23]根据核型分析认为石蒜属是一个杂交复合体。虽然石蒜属有报道和发表的种有近 30 种,但其中有近一半以上是天然或人工杂种、同种异名以及栽培变种等,因此被承认的仅约 20 种^[6]。由于石蒜属植物种间杂交频繁,形态存在连续变异,故仅根据形态性状鉴定该属植物比较困难。虽然染色体在该属分类鉴定上有较好的效果,但是染色体包含的信息有限,不能很好地阐明相同染色体组型的种间关系。Roh 等^[8]用 RAPD 方法对收集的 80 份石蒜材料进行了聚类分析,结果这些材料可分成五类,分析结果与染色体和形态分类结果部分一致,揭示了部分的种间关系,但一些染色体、形态和习性截然不同的种也被聚在一起,而同一种不同个体却分在很远的分支内,因此 RAPD 分析没有很好地解决属内所有种间关系,特别是具有相同染色体组的种间关系。聂刘旺等^[9]、夏齐平等^[24]用同工酶电泳分析安徽产 6 种石蒜属植物,张露等^[10]用 RAPD 分析了中国产的 13 种石蒜属植物,黄想安等^[11]用 AFLP 分析了石蒜属 13 种植物的遗传多样性和亲缘关系,结果表明这些材料可分为两类:一类包括所有具有“A 或 T”(T 对应端部和 A 对应近端部着丝粒染色体)型染色体组型的种,另一类是所有具有“M + A + T”型染色体组型的种,其中“M”(M 对应大的中部着丝粒染色体),这与染色体分类结果基本一致,但石蒜属内的种间关系,特别是具有相同染色体组的种间系统关系和起源仍未彻底的澄清,其原因可能在于不论酶蛋白还是 DNA 分子标记都是 DNA 序列信息的间接反映,而且酶表达是组织和发育阶段特异性的,且用于分析的同工酶数量有限^[25-26],使得分析结果存在一定误差。DNA 序列分析用于生物种间关系研究,优点在于大量的性状可直接观察到,如碱基变化的转化与颠换,核苷酸的变化趋势,这些变化在物种系统发育分析时都以不同的方式表现出来;这些大大拓宽了研究的范围,更有利于进行生物种间关系、进化和系统发育的研究。尽管 *atpB-rbcL* 间隔区长度仅 900 bp 左右,但这段序列为研究属间、种间甚至居群间的系统发育都提供了重要的信息^[11-13]。

atpB-rbcL 序列分析结果表明 20 个分类群可分成两大支。在第一支内,杂种 2、短蕊石蒜、乳白石蒜和换锦花组成了具有 89% 自展支持率的次级

分支,揭示了它们具有很近的亲缘关系,其中换锦花因是人工杂种 2 的母本而与之聚在一起,显示用叶绿体 *atpB-rbcL* 序列分析石蒜种间亲缘关系的可靠性。乳白石蒜和短蕊石蒜花形和花色极其相似,前者花被初始淡黄后变为乳白,后者花被初为浅黄后变为白色,并且二者都具有“M + T + A”混合型染色体组,因此 Kurita 和 Hsu 认为这两个种很可能是杂交起源^[23],即 1 个未减数的 6M + 10T 配子与 1 个正常减数的 11A 配子杂交,但是无法确定具体的亲本来源;林巾箴等^[18]通过杂交实验得到的大量杂种中有两个(杂种 1 和 2)与短蕊石蒜和乳白石蒜极为相似,核型也完全一致,因此她推测短蕊石蒜和乳白石蒜起源于中国石蒜和换锦花的杂交。本实验 *atpB-rbcL* 序列分析结果显示杂种 2、短蕊石蒜和乳白石蒜这三者与换锦花具有非常高的序列同源性,因此 *atpB-rbcL* 序列分析进一步验证了短蕊石蒜和乳白石蒜是杂交起源的推测。由于石蒜属植物叶绿体 DNA 是母系遗传的,所以 *atpB-rbcL* 序列分析结果进一步揭示了乳白石蒜和短蕊石蒜染色体组中近端部着丝粒(A)染色体是来源于它们的母本换锦花的 A 染色体组。

玫瑰石蒜、红蓝石蒜和换锦花 3 种都具有红色带蓝点且形态相似的花被片,核型也相同,较难区分,特别是玫瑰石蒜和红蓝石蒜常被混淆。林巾箴等^[18]根据杂交实验,认为玫瑰石蒜是换锦花和二倍体石蒜的杂种,而红蓝石蒜则是换锦花和矮小石蒜的杂种, Kurita^[27-28]根据染色体核型分析结果支持林巾箴等的结论, *atpB-rbcL* 序列证据显示换锦花与玫瑰石蒜、红蓝石蒜具有极近的亲缘关系,由于叶绿体 *atpB-rbcL* 序列有母系遗传的特点,因此进一步揭示换锦花是玫瑰石蒜和红蓝石蒜的母本。

二倍体、三倍体石蒜、血石蒜和黄花石蒜聚在同一个分支,获得 100% 的自展支持率,说明他们具有极近的亲缘关系。Lee 等^[29]根据等位酶分析,认为黄花石蒜是中国石蒜和血石蒜的杂种,并且血石蒜可能是一个异源四倍体杂种。*atpB-rbcL* 序列分析结果证实血石蒜可能是黄花石蒜的母本,并且如果血石蒜是异源四倍体,二倍体石蒜很可能参与了其物种形成过程,虽然 *atpB-rbcL* 序列分析结果表明它们具有极近的亲缘关系,但 *atpB-rbcL* 序列分析不能确定血石蒜是否是异源多倍体,对于血石蒜是否是异源多倍体还需要用核 DNA 序列分析方法来证实。

另外,二倍体、三倍体石蒜 2 个变种的 *atpB-rbcL* 序列同源性极高,且这两个变种形态和核型完全相同,说明它们具有极近的亲缘关系,揭示三倍体石蒜可能是二倍体石蒜的一个减数配子和一个未减数配子的杂交种^[30]。

在第一支内,杂种 1、矮小石蒜、麦秆石蒜和江苏石蒜具有 96% 自展支持率,聚在同一个分支,揭示了它们具有非常近的亲缘关系,其中矮小石蒜由于是人工杂种 1 的母本而与之聚在一起。麦秆石蒜和江苏石蒜都具有白色花被和非常相似的形态,并且具有“M + T + A”型染色体组,因此 Kurita 和 Hsu 认为这 2 种很可能是杂交起源^[23]。*atpB-rbcL* 序列分析结果显示了麦秆石蒜和江苏石蒜与杂种 1 和矮小石蒜具有非常近的关系,这验证了麦秆石蒜和江苏石蒜是杂交起源的推测,由于叶绿体 DNA 具有母系遗传的特点,因此可以推断麦秆石蒜和江苏石蒜染色体组中近端部着丝粒(A)染色体是来自它们的母本矮小石蒜 A 染色体组。

在第二支内,所有具有中部和端部着丝粒染色体的石蒜聚在一起,具有 96% 的支持率,揭示它们具有非常近的亲缘关系。鹿葱和香石蒜是具有“M + T + A”混合型染色体组的 2 种,根据染色体组型及花被颜色和形态, Kurita^[27-28]推测鹿葱和香石蒜起源于长筒石蒜和换锦花的杂交。本实验中鹿葱、香石蒜和长筒石蒜构成一个次级分支并具有 100% 的自展支持率,揭示了长筒石蒜是鹿葱和香石蒜的母本。安徽石蒜和黄长筒石蒜 *atpB-rbcL* 序列同源性极高,这 2 种不仅染色体核型完全一致,形态上也仅仅是花色不同,花被筒长度略有差异。因此,安徽石蒜与黄长筒石蒜的关系非常密切,很值得深入研究,本研究认为安徽石蒜作为长筒石蒜的 1 个变种似乎更合适。另外,在这个分支内忽地笑和中国石蒜也组成一个次级分支(90%),这 2 种形态相似,花色均为黄色,不同之处仅在于叶秋出或春出,二者组成 1 个姐妹群,揭示中国石蒜和忽地笑也具有较近的亲缘关系。

从系统发育树上,叶绿体 *atpB-rbcL* 序列分析显示的石蒜属种间关系与染色体分类的结果既有一致性又存在矛盾之处。一致性在于全部是“A”(近端部着丝粒)染色体的种与全部为“M + T”(中部和端部着丝粒)染色体的种分别组成 1 个单系类群,与形态和细胞学特征一致;矛盾之处在于具有“M + T + A”3 种染色体类型的种分散在两

个分支内,这可能是由于叶绿体是单亲遗传,杂种中的 cpDNA 仅来自母本,因此在用 cpDNA 研究它们的种间关系时这些杂种与它们的母本聚在一起,因而导致了这些杂种分散在其他支内,本实验的 cpDNA 序列分析结果进一步验证了这些具有 3 种染色体组型的石蒜是杂交起源的,而且揭示了它们可能的母本来源。我们认为石蒜属内乳白石蒜、短蕊石蒜、江苏石蒜、香石蒜、鹿葱、麦秆石蒜和黄花石蒜是自然杂交种,野外调查时未观察到这些种的野生居群分布,是否确立其种的地位值得重新考虑。

致谢 感谢日本千叶大学 Siro Kurita 教授、杭州植物园林巾箴研究员、浙江林学院楼焯焯教授和南京中山植物园刘启新研究员惠赠并鉴定部分材料;感谢浙江大学傅承新教授和邱英雄教授从实验到写作给予的悉心指导;感谢杭州师范大学金孝锋教授帮助鉴定部分材料、杭州植物园卢毅军研究员和张海珍研究员帮助采集部分材料。

参考文献

- [1] Xu Y, Hu Z B, Huang X L, et al. *Lycoris* Herb. [M]// Pei J, Ding Z Z. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 16(1). Beijing: Science Press, 1985: 18–27.
徐垠, 胡之璧, 黄秀兰, 等. *Lycoris* Herb. [M]// 裴鉴, 丁志遵. 中国植物志 第16卷第1分册. 北京: 科学出版社, 1985: 18–27.
- [2] Wang R S. The ecogeography concerning genus *Lycoris* [J]. J SW For Coll, 1990, 10(1): 41–48.
王仁师. 关于石蒜属(*Lycoris*)的生态地理 [J]. 西南林学院学报, 1990, 10(1): 41–48.
- [3] Shao J Z, Yang J G, Zhang D C, et al. The discovery of diploid *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. from Anhui [J]. Acta Phytotaxon Sin, 1994, 32(6): 549–552.
邵建章, 杨积高, 张定成, 等. 二倍体石蒜在安徽发现 [J]. 植物分类学报, 1994, 32(6): 549–552.
- [4] Kurita S. Variation and evolution in the karyotype of *Lycoris*, Amaryllidaceae: I. General karyomorphological characteristics of the genus [J]. Cytologia, 1986, 51(4): 803–815.
- [5] Zhou S B, Yu B Q, Luo Q, et al. Karyotypes of six populations of *Lycoris radiata* and discovery of the tetraploid [J]. Acta Phytotaxon Sin, 2007, 45(4): 513–522.
周守标, 余本祺, 罗琦, 等. 六个石蒜居群的核型及四倍体石蒜的发现 [J]. 植物分类学报, 2007, 45(4): 513–522.
- [6] Hus P S, Kurita S, Yu Z Z, et al. Synopsis of the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae) [J]. Sida, 1994, 16(2): 301–331.
- [7] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J].

- Nucl Acids Res, 1990, 18(22): 6531–6535.
- [8] Roh M S, Kurita S, Zhao X Y, et al. Identification and classification of the genus *Lycoris* using molecular markers [J]. J Kor Hort Sci, 2002, 43(2): 120–132.
- [9] Nie L W, Zhang D C, Zhang H J, et al. A study on three isozymes in plant of *Lycoris* Herb. [J]. J Biol, 2000, 17(3): 19–22.
聂刘旺, 张定成, 张海军, 等. 安徽产石蒜属植物三种同工酶的分析 [J]. 生物学杂志, 2000, 17(3): 19–22.
- [10] Zhang L, Cai Y M, Zhu G Q, et al. Analysis of the inter-specific relationships on *Lycoris* (Amaryllidaceae) by use of RAPD [J]. Acta Genet Sin, 2002, 29(10): 915–921.
张露, 蔡友铭, 诸葛强, 等. 石蒜属种间亲缘关系RAPD分析 [J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 915–921.
- [11] Huang X A, Dong M F, Yan X Y, et al. Analysis of genetic relationships among species of *Lycoris* Herb. by AFLP markers [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2011, 42(1): 148–152.
黄想安, 董美芳, 阎学燕, 等. 石蒜属种间亲缘关系AFLP分析 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 148–152.
- [12] Manen J F, Natali A. Comparison of the evolution of *rbcL* and *atpB-rbcL* noncoding spacer sequences in a recent plant group, the tribe Rubieae (Rubiaceae) [J]. J Mol Evol, 1995, 41(6): 920–927.
- [13] Manen J F, Natali A. The chloroplast *atpB-rbcL* spacer in Rubiaceae [M]// Robbrecht E, Puff C, Smets E. Second International Rubiaceae Conference Proceedings (Opera Botanica Belgica, Vol. 7). Brussels: National Botanic Garden of Belgium, 1996: 51–57.
- [14] Chiang T Y, Schaal B A, Peng C I. Molecular evolution and phylogeny of the *atpB-rbcL* spacer of chloroplast DNA in the true mosses [J]. Genome, 2000, 43(3): 417–426.
- [15] Chiang T Y, Schaal B A. Molecular evolution of the *atpB-rbcL* noncoding spacer of chloroplast DNA in the moss family Hylocomiaceae [J]. Bot Bull Acad Sin, 2000, 41(3): 85–92.
- [16] Yun J H, Sun S, Peng F, et al. Genetic variations in *trnL-F* sequence and phylogenetic clustering of *Lycoris* species [J]. China J Chin Mat Med, 2008, 33(13): 1523–1527.
袁菊红, 孙视, 彭峰, 等. 石蒜属叶绿体 *trnL-F* 序列的变异与系统聚类分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(13): 1523–1527.
- [17] Quan M H, Ou L J, She C W, et al. Analysis of interspecific relationships in *Lycoris* Herb. based on *trnH-psbA* sequence [J]. Acta Hort Sin, 2011, 38(8): 1589–1594.
全妙华, 欧立军, 余朝文, 等. 中国石蒜属种间关系的 *trnH-psbA* 序列分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1589–1594.
- [18] Lin J Z, Yu Z Z, Hsu P S. Hybridization and breeding of *Lycoris* [M]// He S A. Proceedings of the International Symposium on Botanical Garden. Nanjing: Jiangsu Science & Technology Publishing House, 1990: 557–568.
- [19] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19(1): 11–15.
- [20] Chiang T Y, Schaal B A, Peng C I. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA [J]. Bot Bull Acad Sin, 1998, 39(4): 245–250.
- [21] Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) 4.0 Beta [CD]. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2002.
- [22] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406–425.
- [23] Kurita S, Hsu P S. Hybrid complexes in *Lycoris*, Amaryllidaceae [J]. Amer J Bot, 1996, 83(6, Suppl.): 207.(Abstract)
- [24] Xia Q P, Yu B Q, Zhou S B. Study on evolution relationships of different species in lycoris and different populations in *Lycoris radiata* based on POD isozyme [J]. J Anhui Norm Univ (Nat Sci), 2011, 34(2): 154–159.
夏齐平, 余本祺, 周守标. 基于POD同工酶对石蒜属种间和石蒜居群间进化关系的研究 [J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2011, 34(2): 154–159.
- [25] Rieseberg L H. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons [J]. Mol Ecol, 1996, 5(1): 99–105.
- [26] Wolfe A D, Liston A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology [M]// Soltis D E, Soltis P S, Doyle J J. Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing. New York, USA: Kluwer Academic Publishers, 1998: 43–86.
- [27] Kurita S. Chromosome evolution in *Lycoris* [J]. Proc Jpn Soc Plant Taxon, 1987, 4(1): 8–9.
- [28] Kurita S. Variation and evolution in the karyotype of *Lycoris*, Amaryllidaceae: VII. Modes of karyotype alteration within species and probable trend of karyotype evolution in the genus *Lycoris* [J]. Cytologia, 1988, 53(2): 323–335.
- [29] Lee N S, Kim M, Lee B S, et al. Isozyme evidence for the allotriploid origin of *Lycoris flavescens* (Amaryllidaceae) [J]. Plant Syst Evol, 2001, 227(3/4): 227–234.
- [30] Liu Y, Hsu P S. A study on karyotypes of the genus *Lycoris* [J]. Acta Phytotaxon Sin, 1989, 27(4): 257–264.
刘琰, 徐炳声. 石蒜属的核型研究 [J]. 植物分类学报, 1989, 27(4): 257–264.