

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201512021

引文格式: 陈超南, 陆嘉惠, 李学禹, 等. 甘草属种间杂交种叶绿体 DNA 父系遗传的发现及分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(2):162-168
CHEN CN, LU JH, LI XY, et al. Inheritance analysis and discovery of chloroplast paternal inheritance in interspecific crossing of *Glycyrrhiza* [J]. Guihaia, 2017, 37(2):162-168

甘草属种间杂交种叶绿体 DNA 父系遗传的发现及分析

陈超南¹, 陆嘉惠^{1,2,3*}, 李学禹³, 周玲玲¹, 谢良碧¹, 李晓岚¹, 宋 凤¹

(1. 石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆 石河子 832003; 3. 石河子大学 甘草研究所, 新疆 石河子 832003)

摘要: 通过对甘草属乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)、光果甘草 (*G. glabra*)、胀果甘草 (*G. inflata*) 及其人工杂交种组合 *G. uralensis* ♀ × *G. glabra* ♂、*G. glabra* ♀ × *G. uralensis* ♂、*G. uralensis* ♀ × *G. inflata* ♂、*G. inflata* ♀ × *G. uralensis* ♂ 共 68 份材料的核基因 ITS 序列、叶绿体 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 基因的序列分析, 探讨了甘草属叶绿体 DNA 遗传方式。结果表明: (1) 亲本种和人工杂交种 ITS 序列长度均为 614 bp, 其中 34 份人工杂交种 ITS 序列存在 4 处变异位点, 且人工杂交种均检测出来自父本、母本 ITS 序列相同位点碱基的叠加, 检测率为 100%。(2) 亲本种与人工杂交种的叶绿体基因 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 序列长度相同, 共有 4 处变异位点, 人工杂交种在变异位点处的碱基与其相对应的父本碱基一致率高达 97.1%。以上结果说明, 该研究获得 34 份人工杂交种为 100% 杂交成功的 F₁ 子代, 核基因 ITS 序列可用于甘草属杂交种的遗传鉴定; 甘草属叶绿体 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 基因具有父系遗传特性, 推测甘草属质体的遗传方式主要表现为父系遗传, 这种质体遗传方式的发现为甘草属杂交种和遗传多样性研究提供了新的认识, 也为杂交种的亲本鉴定提供分子依据。

关键词: 甘草属, 种间杂交, ITS, 叶绿体 DNA, 父系遗传

中图分类号: Q943, Q37 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2017)02-0162-08

Inheritance analysis and discovery of chloroplast paternal inheritance in interspecific crossing of *Glycyrrhiza*

CHEN Chao-Nan¹, LU Jia-Hui^{1,2,3*}, LI Xue-Yu³, ZHOU Ling-Ling¹,
XIE Liang-Bi¹, LI Xiao-Lan¹, SONG Feng¹

(1. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China; 2. Key Oasis Eco-Agriculture Laboratory of Xinjiang Production and Construction Group, Shihezi 832003, Xinjiang, China; 3. Institute of Licorice in Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China)

Abstract: The goal of this paper was to have a better understanding of chloroplast inheritance patterns and identify the hybrid parent in *Glycyrrhiza*. A total of 68 individuals of *Glycyrrhiza* were selected including 34 parental species, *G. uralensis*, *G. glabra*, *G. inflata* and 34 artificial interspecific crosses, *G. uralensis* ♀ × *G. glabra* ♂, *G. glabra* ♀ × *G. uralensis* ♂, *G. uralensis* ♀ × *G. inflata* ♂ and *G. inflata* ♀ × *G. uralensis* ♂. Thirty-four artificial interspecific crosses were performed and the sequence polymorphisms of chloroplast DNA (cpDNA) and internal transcribed spacer (ITS) of nuclear gene of parents and progenies were studied. Sequence analysis showed that ITS sequences of parents and progenies

收稿日期: 2015-12-22 修回日期: 2016-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(31260042); 国家重点基础研究发展计划(2014CB954203); 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZX201430) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(31260042); National Key Basic Research Program of China (2014CB954203); Startup Program for Scientific Research High-level Personnel of Shihezi University (RCZX201430)].

作者简介: 陈超南(1988-), 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源研究, (E-mail) ccnchaonan@126.com.

*通信作者: 陆嘉惠, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药用植物资源研究, (E-mail) jiahuil@shzu.edu.cn.

had the same length of 614 bp and altogether four variable sites, with three genotypes. Two different ITS sequence copies at four variable sites were found in each individual of F_1 hybrids, one from the paternal and the other from the female parent, about which the detection ratio was 100%. It suggested that 34 artificial interspecific crosses produced successful F_1 hybrids in this research and genetic trait of ITS could infer parents of *Glycyrrhiza*. Sequence analysis showed that the cpDNA *rbcL*, *matK* and *trnH-psbA* sequences of parents and artificial interspecific crosses had the same length, within a total of four variable sites and six genotypes. Two different cpDNA haplotypes were found in *Glycyrrhiza*. The cpDNA haplotypes of F_1 hybrids matched those of the male parents and that ratio was up to 97.1%, indicating that the genetic trait was mainly inherited from the paternal parent. This result demonstrated that the chloroplast inheritance pattern of *Glycyrrhiza* was mostly paternal inheritance, which provides new insights into the use of cpDNA markers in studies of natural hybrids and genetic polymorphism in *Glycyrrhiza*.

Key words: *Glycyrrhiza*, interspecific crossing, ITS, chloroplast DNA, paternal inheritance

豆科 (Leguminosae) 甘草属 (*Glycyrrhiza* L.) 植物全世界约 20 种, 主要分布在中亚、北美及东欧, 我国甘草属植物以新疆、内蒙古、宁夏和甘肃为主要分布区 (李学禹和陆嘉惠, 2015)。相关研究均提出在甘草属中可能存在自然杂交种, 张鹏云和彭泽祥 (1960) 根据甘草的形态推测, 认为存在胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata*) 和乌拉尔甘草 (*G. uralensis*) 的天然杂交种; 而苏联学者认为自然界存在光果甘草 (*G. glabra*) 与乌拉尔甘草 (*G. uralensis*) 的杂交种 (李学禹, 1993); 谢良碧等 (2014) 通过甘草属种间杂交亲和性分析和杂交种的幼苗形态观察, 提出同域分布区内的乌拉尔甘草 (*G. uralensis*)、光果甘草 (*G. glabra*)、胀果甘草 (*G. inflata*), 由于花期重叠, 共有传粉昆虫, 种间有自然杂交的可能; 李晓岚等 (2015) 利用 EST-SSR 分子标记技术, 构建甘草属植物遗传分化聚类图, 结果表明存在 *G. inflata* × *G. uralensis* 或者 *G. inflata* × *G. glabra* 的天然杂交种。但有关疑似杂交种的杂交起源及其亲本的推断, 目前仍需要进一步寻找证据。自然杂交种父本、母本的确是揭示其杂交起源和分类地位的关键。由于核 DNA 是双亲遗传, 比较核 DNA 序列组成, 通常能够找出其双亲起源, 例如位于核糖体 18S rDNA 和 26S rDNA 基因间隔的 ITS 序列 (李小娟等, 2007; Steiner & Cruz, 2009)。大多被子植物的叶绿体 DNA 通过雌配子以母系遗传的方式传递 (胡适宜, 1997; 方晓华等, 2003; Zhang et al, 2003), 比较杂交个体及其可能亲本的叶绿体 DNA 序列, 可以揭示其母本起源 (余姣君等, 2014; 王莹等, 2015)。但也有一些类群叶绿体基因被证明为父系遗传, 例如大部分的裸子植物 (Neale & Sederoff, 1989; 刘兴梁和胡适宜, 1995; Gou et al, 2005), 被子植物中的胡萝卜属 (Boblenz et al, 1990)、牵牛属 (胡赞民等, 1996)、

猕猴桃属 (Testolin & Cipriani, 1997)、蒺藜属 (Yang et al, 2000) 等。甘草属植物的叶绿体基因为母系遗传还是父系遗传? 尚未见有相关报道。阐明甘草属叶绿体基因遗传特性, 才能准确、客观地对杂交种的父本、母本做出科学判断, 为揭示疑似杂交种的杂交起源和分类地位提供依据。

本研究在前期研究已获得的甘草属种间杂交种幼苗的基础上 (谢良碧等, 2014), 以不同杂交组合的子代及其已知亲本为材料, 通过核 DNA 的 ITS 和叶绿体 DNA 的 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 片段扩增和测序, 分析了亲本种及杂交种的序列。其主要目的在于: (1) 通过双亲遗传的 ITS 序列分析, 筛选出杂交成功, 含有已知父本、母本基因的 F_1 代, 以用于叶绿体遗传规律的分析。(2) 通过叶绿体 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 基因的分析, 揭示亲本和 F_1 代叶绿体 DNA 遗传方式。(3) 在以上研究基础上, 分析甘草属 ITS 及叶绿体 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 序列在甘草属杂交种的鉴定研究中的应用价值, 为甘草属疑似杂交种的鉴定及其分类地位探讨提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

用于测序分析的材料包括 34 个亲本种和 34 个人工杂交种: 乌拉尔甘草 (*G. uralensis*)、光果甘草 (*G. glabra*)、胀果甘草 (*G. inflata*) 和正反交人工杂交种 *G. uralensis* ♀ × *G. glabra* ♂、*G. glabra* ♀ × *G. uralensis* ♂、*G. uralensis* ♀ × *G. inflata* ♂、*G. inflata* ♀ × *G. uralensis* ♂, 共 68 份。取亲本种植株的成熟健康叶片和人工杂交后获得的杂交种幼苗的新鲜叶片, 采集后迅速用硅胶干燥, 待叶片彻底干燥后存放于 -20 °C 冰箱备用。

1.2 方法

每份材料,称取叶片 20 mg 研磨成粉状,用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根公司),按说明书操作提取总 DNA。

核 DNA 的 ITS 序列和叶绿体 DNA 中 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 序列引物参照 Kondo et al(2007)的设计,引物经生工生物工程(上海)股份有限公司合成。扩增反应在 Biometra 070-851 PCR 仪上进行。采用 50 μ L 的 PCR 反应体系:TaKaRa PrimeSTAR Max DNA Polymerase (北京六合通经贸有限公司) 25 μ L,引物各 2 μ L,模板 DNA 4 μ L,最后超纯水(ddH₂O)补足至 50 μ L。PCR 反应条件为 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 36 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测片段后,在凝胶成像仪上观察,切下目的条带,经凝胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]回收处理后,送往北京六合华大基因科技股份有限公司,采用 ABI 3700 型自动测序仪进行重复测序。

1.3 数据分析

测序结果使用 SnapGene 观察峰图后,借助 MEGA 4.0 进行人工校对,手动删除不可信的位点,并用 DNAMAN 软件进行多序列比对及分析。通过豆科中的锦鸡儿属(侯鑫等,2008)、甘草属 ITS 序列的研究(刘春生等,2005),确定本实验的 ITS 序列边界,对照峰图,手工筛选碱基叠加位点,分析杂交位点。叶绿体基因型的确定,参照 Kondo et al(2007)的设计。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列分析

亲本种和人工杂交种共 68 份的核基因 ITS 序列测序结果表明,其长度均为 614 bp。如图 1 所示,ITS 有 4 种多态性位点,其中 ITS1 含有 1 处变异位点;ITS2 含有 3 处变异位点。根据变异位点分析,可以将核基因 ITS 基因型分为 3 种,分别是 I-1、I-2、I-3 型,其中 I-2 型为杂合型(表 1)。乌拉尔甘草的 17 个样本均有 4 处变异位点,分别为 187(C)、411(T)、412(G)、413(C),显示了种内较高的保守性;光果甘草和胀果甘草具有相同的变异位点,均为 187(T)、411(C)、412(A)、413(A),说明其亲缘关

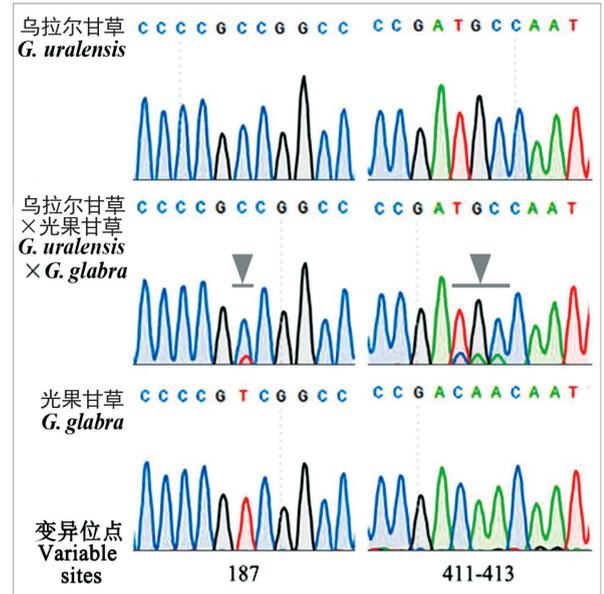


图 1 核基因 ITS 序列在变异位点峰图叠加示意
Fig. 1 Overlapping peaks of variable sites in the nuclear gene ITS

表 1 甘草属 ITS、*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 序列的基因型
Table 1 Genotypes of the ITS, the *rbcL* gene, the *matK* gene and the *trnH-psbA* intergenic region in *Glycyrrhiza*

序列 Sequence	基因型 Genotype	碱基位点 Base site	
		187	411-413
ITS	I-1	C	TGC
	I-2	Y	YRM
	I-3	T	CAA
序列 Sequence	基因型 Genotype	碱基位点 Base site	
		26	56
<i>rbcL</i>	R-1	G	A
	R-4	A	T
序列 Sequence	基因型 Genotype	碱基位点 Base site	
		38-45	
<i>matK</i>	M-1	CTTATT	
	M-2	Deletion	
序列 Sequence	基因型 Genotype	碱基位点 Base site	
		55	
<i>trnH-psbA</i>	T-1	C	
	T-2	T	

注:表中简并碱基组成为 Y=C+T, R=A+G, M=A+C。

Note: Degenerate base composition is Y=C+T, R=A+G, M=A+C.

表 2 甘草属亲本种及其杂交种的叶绿体 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 的基因型比较Table 2 Comparison of chloroplast *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* of parental and hybrid genotypes in *Glycyrrhiza*

组合 Form	物种 Species	个数 Number	叶绿体 chloroplast				O/N	遗传方式 Inheritance pattern
			<i>rbcL</i> 基因型 <i>rbcL</i> genotype	<i>matK</i> 基因型 <i>matK</i> genotype	<i>trnH-psbA</i> 基因型 <i>trnH-psbA</i> genotype			
组合 1 Form 1	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>	7	R-1	M-1	T-1	—	—	
	光果甘草 <i>G. glabra</i>	7	R-4	M-2	T-2	—	—	
	乌拉尔甘草 × 光果甘草 <i>G. uralensis</i> ♀ × <i>G. glabra</i> ♂	7	R-4	M-2	T-2	6/7	父系遗传 Paternal inheritance	
			R-1	M-1	T-1	1/7	母系遗传 Maternal inheritance	
组合 2 Form 2	光果甘草 × 乌拉尔甘草 <i>G. glabra</i> ♀ × <i>G. uralensis</i> ♂	7	R-1	M-1	T-1	7/7	父系遗传 Paternal inheritance	
	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i>	10	R-1	M-1	T-1	—	—	
	胀果甘草 <i>G. inflata</i>	10	R-4	M-2	T-2	—	—	
	乌拉尔甘草 × 胀果甘草 <i>G. uralensis</i> ♀ × <i>G. inflata</i> ♂	10	R-4	M-2	T-2	10/10	父系遗传 Paternal inheritance	
	胀果甘草 × 乌拉尔甘草 <i>G. inflata</i> ♀ × <i>G. uralensis</i> ♂	10	R-1	M-1	T-1	10/10	父系遗传 Paternal inheritance	

注: “O/N”表示 F1 代母系或父系遗传个体数与相应 F1 代总个体数的比例; “—”表示没有数据。

Note: “O/N” indicates the proportion of F1 maternal or paternal genetic number of individuals with the corresponding total number of individuals of the F1; “—” indicates no data.

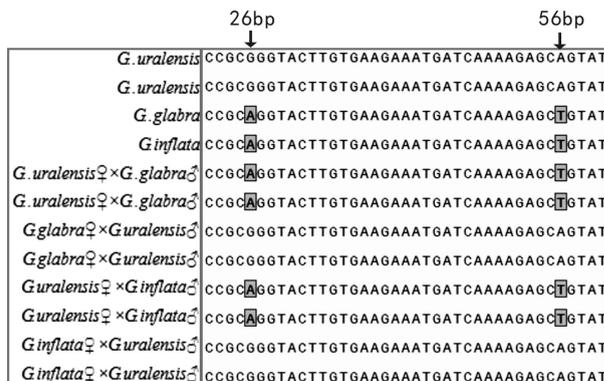


图 2 甘草属亲本、杂交种叶绿体基因 *rbcL* 基因变异位点比较

Fig. 2 Comparison on gene *rbcL* gene variable sites of chloroplast in *Glycyrrhiza* parents and hybrids

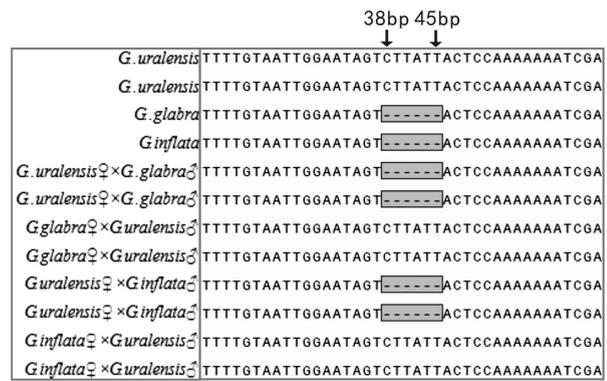


图 3 甘草属亲本、杂交种叶绿体基因 *matK* 基因变异位点比较

Fig. 3 Comparison on gene *matK* gene variable sites of Chloroplast in *Glycyrrhiza* parents and hybrids

系较近;34 份人工杂交种在 4 个变异位点处均出现其亲本种的叠加峰现象,分别为 187(Y)、411(Y)、412(L)、413(M),应为杂合位点,说明已经获得成功的人工杂交种。

2.2 叶绿体 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 基因序列分析

亲本种和人工杂交种的叶绿体基因测序结果经比对、剪切后,得到 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 序列长度分别为 124、96、177 bp,共有 4 处变异位点,有 6 种

基因型(表 2),其中 *rbcL* 有 2 种基因型,为 R-1、R-4; *matK* 有 2 种基因型为 M-1、M-2; *trnH-psbA* 有 2 种基因型为 T-1、T-2。如图 2-4 所示,乌拉尔甘草 17 个样本,基因型均为 R-1、M-1、T-1,记为 H1 型,所测叶绿体基因片段一致,说明该物种内保守性较高;光果甘草和胀果甘草叶绿体基因型为 R-4、M-2、T-2,记为 H2 型,说明光果甘草和胀果甘草亲缘关系较近;人工杂交种 *rbcL* 序列为 2 处碱基替换突变;

	55bp ↓
<i>G. uralensis</i>	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. uralensis</i>	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. glabra</i>	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. inflata</i>	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. uralensis</i> ♀× <i>G. glabra</i> ♂	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. uralensis</i> ♀× <i>G. glabra</i> ♂	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. glabra</i> ♀× <i>G. uralensis</i> ♂	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. glabra</i> ♀× <i>G. uralensis</i> ♂	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. uralensis</i> ♀× <i>G. inflata</i> ♂	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. uralensis</i> ♀× <i>G. inflata</i> ♂	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. inflata</i> ♀× <i>G. uralensis</i> ♂	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC
<i>G. inflata</i> ♀× <i>G. uralensis</i> ♂	TAAATGTATAAAATTATCTAACTTTCCATTTAGACTTTTTTC

图 4 甘草属亲本、杂交种叶绿体基因 *trnH-psbA* 基因变异位点比较

Fig. 4 Comparison on gene variable sites of chloroplast gene *trnH-psbA* in *Glycyrrhiza* parents and hybrids

matK 序列为 1 处碱基缺失突变; *trnH-psbA* 序列有 1 处碱基替换突变。人工杂交种的叶绿体 DNA 与其母本的基因型相同的个数为 1 株, 占总体人工杂交种的比例为 2.9%, 而与其相对应的父本基因型相同的个数为 33 株, 占总体人工杂交种的比例为 97.1% (表 2, 图 2-4)。故人工杂交种叶绿体 DNA 遗传方式主要表现为父系遗传。

3 讨论

3.1 核基因 ITS 序列在甘草属植物杂交种鉴定的应用

随着分子技术的发展, 核基因 ITS 序列测序技术也应用到杂交种的鉴定中。ITS 序列为双亲遗传, 子代在双亲相同位点会出现碱基的叠加 (范文月等, 2011)。该序列被认为是鉴定杂交种有用的分子标记基因 (严容, 2009)。通常, 如果一些植物类群的疑难种是杂交造成的, 则在这些疑难种 ITS 序列的突变位点中会检测到其双亲碱基的叠加, 进而可以对疑似亲本做出判断。如杨威等 (2011) 借助 ITS 序列分析, 揭示了自然杂交种的亲本为兴安白头翁和朝鲜白头翁; 吴杰等 (2015) 对分布于云南的旱柳和云南柳之间的自然杂交种进行研究, 结果表明疑似杂交种 ITS 序列的基因型为疑似亲本的嵌合体。以上研究表明, 核基因 ITS 序列能揭示一些疑似杂交种的真实身份。本研究中, 亲本种和人工杂交种的 ITS 序列长度均为 614 bp, 34 个人工杂交种的 ITS 序列均有 4 处杂合位点, 均表现为相应亲本种的碱基叠加, 这与 Kondo et al (2007) 对甘草属

野生疑似杂交种及其自然种群的乌拉尔甘草、光果甘草及胀果甘草 ITS 序列分析的 4 个变异位点的研究结果是一致的。因此, 本研究所获得的人工杂交种是可信并可进一步用于双亲与子代遗传关系的分析。同时, 本研究对可控双亲及人工杂交后代的 ITS 序列分析的结果, 也将为揭示自然界甘草属杂交现象和杂交种鉴定提供更有利的分子证据。

3.2 甘草属叶绿体 DNA 父系遗传的推定

到目前为止, 关于豆科植物叶绿体 DNA 遗传方式的研究报道表明, 该科不同属、种的质体遗传方式并不一致: Parker (1934) 通过对菜豆花叶突变体杂交的实验, 首次证明了菜豆质体遗传方式为双亲遗传; 之后一些学者借助细胞学的方法, 证明豌豆 (刘兴梁和胡适宜, 1995)、大豆、野生大豆 (胡适宜, 1997)、菜豆 (刘兴梁, 1997) 的质体遗传方式为母系遗传; 父系遗传的报道仅见苜蓿属的紫花苜蓿 (Schumann & Hancock, 1989; Masoud et al, 1990; Dudas et al, 2012)。本研究通过对甘草属已知亲本种及其杂交种的叶绿体基因中 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 片段的序列分析, 共得到 4 处变异位点, 基因型可分成两种, 一种类型为 H1 型, 另一种为 H2 型。正反交的人工杂交种的叶绿体 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 的变异位点、基因型与其相应父本的基因型一致率高达 97.1%。以上结果表明, 甘草属叶绿体中的 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 片段主要为父系遗传。初步推测甘草属的质体遗传方式主要表现为父系遗传, 而是否为低、高频父系遗传, 还有待进一步研究和验证。

3.3 甘草属叶绿体基因遗传的复杂性

在同属植物中质体的遗传方式基本一致, 所以叶绿体基因遗传方式在属内是可以推测的 (Zhong et al, 2011)。本研究中叶绿体遗传方式为父系遗传的比率高达 97.1%, 说明在甘草属中主要表现为父系遗传; 其次, 叶绿体遗传方式表现为母系遗传的比率为 2.9%, 说明甘草属叶绿体基因遗传方式并不是单向的父系或母系遗传, 而是混合的, 但以父系遗传为主, 这种混合的叶绿体遗传模式在猕猴桃等其它双子叶植物均有发现 (Li et al, 2013; Anja et al, 2015)。叶绿体基因遗传方式的多样性可能会降低杂交频率和转移基因渐渗的方向 (Li et al, 2013), 影响种群结构和物种的遗传分化。甘草属植物叶绿体基因遗传的复杂性的发现, 将为进一步对该属种群结构、遗传分化及物种进化的研究提供了有力证据。

3.4 甘草属叶绿体基因父系遗传方式对物种遗传多样性的影响

叶绿体是绿色植物物质体的主要类型, 叶绿体 DNA 为母系遗传的植物, 在同一母株上形成的后代, 其叶绿体单倍型是完全一致的。但叶绿体 DNA 为父系遗传方式的植物, 如果自然环境中存在稳定的花粉传播途径, 如风媒或虫媒, 可以使叶绿体单倍型通过花粉散布, 这样, 同一母株上有多个父系的叶绿体单倍型, 因而可能比母系遗传植物具有更高的叶绿体单倍型多态性(张田等, 2007)。现已证明在裸子植物中父系遗传较为普遍(Neale & Sederoff, 1989; 刘兴梁和胡适宜, 1995; Gou et al, 2005), 此遗传方式, 也为裸子植物遗传多样性提供了证据。在被子植物中, 猕猴桃属叶绿体遗传方式前期被认为是严格的父系遗传(Testolin & Cipriani, 1997; Cipriani et al, 1995; Chat et al, 1999), 后 Li et al (2013) 通过 AFLP 和测序技术对猕猴桃属种间杂交植物进行研究, 得出猕猴桃属叶绿体不仅具有父系遗传的特性, 还具有母系及双亲遗传的特性。猕猴桃属虫媒或风媒的混合传粉, 使该属植物维持了较高水平的遗传多样性, 同时也是一个具有自然杂交和基因渐渗的类群(张田等, 2007; Li et al, 2002; Chat et al, 2004)。由此可见, 叶绿体 DNA 为父系遗传的植物类群, 其遗传多样性的组成应该比母系遗传的类群更为复杂和丰富。

在前期研究工作中, 对甘草属自然种群的繁殖系统和杂交现象、遗传多样性研究与猕猴桃属植物研究结果相似, 其种间过渡类型复杂(李学禹和陆嘉惠, 2015), 同域分布种存在花期重叠、杂交亲和现象(廖云海, 2011; 田润炜等, 2013), 种间杂交亲和性最高可达 96.67%(谢良碧等, 2014)。较高的种间亲和性使种间花粉交流变得更为频繁, 本研究发现叶绿体父系遗传方式则使这种由花粉流动而带来的遗传基因的变化更为丰富。可以推测, 在属内的同域种分布区, 种间和种内由于频繁的花粉交流, 其叶绿体单倍型在同一母株的不同花序或果序上将会呈现多样性。这不仅丰富了种内的遗传多样性, 也使种间的杂交和遗传变异更为复杂。因此, 甘草属叶绿体父系遗传的特性和种间较高的杂交亲和度, 使花粉流在不同个体间、种内和种间进出, 基因的频繁交流是导致甘草属野生种群种内较高的遗传多样性(李晓岚等, 2015; 张富民, 1995; 陆嘉惠等, 2006) 和种间过渡类型大量出现的原因之一, 也是

导致该属成为疑难种和争议种较多的“困难属”的原因。本研究发现的甘草属叶绿体主要为父系遗传特性, 将为科学、客观地对自然杂交种的杂交起源和亲本鉴定提供有力依据, 同时也为被子植物尤其是双子叶豆科植物的物种进化和演化提供了新的资料。

参考文献:

- ANJA S, CHRISTIAN S, CAROLINE A, et al, 2015. Low frequency paternal transmission of plastid genes in *Brassicaceae* [J]. *Transgenic Res*, 24: 267-277
- BOBLENZ K, NOTHNAGEL T, METZLAFF M, 1990. Paternal inheritance of plastids in the genus *Daucus* [J]. *Archiv Für Ophth*, 220(3): 489-491.
- CHAT J, CHALAK L, PETIT RJ, 1999. Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit [J]. *Theor Appl Genet*, 99(2): 314-322.
- CHAT J, JAUREGUI B, REMY JP, et al, 2004. Reticulate evolution in kiwifruit (*ACTINIDIA*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies [J]. *Am Bot*, 91(5): 736-747.
- CIPRIANI G, TESTOLIN R, MORGANTE M, 1995. Paternal inheritance of plastids in interspecific hybrids of the genus *Actinidia* revealed by PCR-amplification of chloroplast DNA fragments [J]. *Mol Gen Genet*, 247(6): 693-697.
- DUDAS B, JENES B, KISS GB, et al, 2012. Spectinomycin resistance mutations in the *rrn16* gene are new plastid markers in *Medicago sativa* [J]. *Theor Appl Genet*, 125(7): 1517-1523.
- FAN WY, ZHOU CJ, WANG YC, 2011. Confirmation of natural hybrids between two species of *Nitraria* in inner Mongolia based on molecular evidence [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 31(5): 913-919. [范文月, 周成杰, 王迎春, 2011. 内蒙古 2 种白刺间自然杂交类型的分子验证 [J]. *西北植物学报*, 31(5): 913-919.]
- FANG XH, ZHANG F, WU NH, et al, 2003. Plastid inheritance in sweet potato as revealed by DNA restriction fingerprinting [J]. *Acta Bot Sin*, 45(1): 73-75. [方晓华, 张方, 吴乃虎, 等, 2003. 甘薯质体遗传方式的 DNA 指纹图谱分析(英文) [J]. *植物学报*, 45(1): 73-75.]
- GUO FL, HU SY, YUAN ZF, et al, 2005. Paternal cytoplasmic transmission in Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*) [J]. *Protoplasma*, 225(1): 5-14.
- HOU X, LIU JE, ZHAO YZ, 2008. Molecular phylogeny of *Caragana* (Fabaceae) in China [J]. *J Syst Evol*, 46(4): 600-607. [侯鑫, 刘俊娥, 赵一之, 2008. 中国锦鸡儿属的分子系统发育 [J]. *植物分类学报*, 46(4): 600-607.]
- HU SY, 1997. A cytological study of plastid inheritance in angiosperms [J]. *Acta Bot Sin*, 39(4): 363-371. [胡适宜, 1997. 被子植物质体遗传的细胞学研究 [J]. *植物学报*, 39(4): 363-371.]
- HU ZM, HU SY, ZHANG JZ, 1996. Paternal inheritance of plastid DNA in genus *Pharbitis* [J]. *Acta Bot Sin*, 38(4): 253-256. [胡赞民, 胡适宜, 张金忠, 1996. 牵牛属质体 DNA 的父系遗传(英文) [J]. *植物学报*, 38(4): 253-256.]
- KONDO K, SHIBA M, YAMAJI HY, et al, 2007. Species identification of licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers [J]. *Biol Pharm Bull*, 30(8): 1497-1500.

- LI D, QI XQ, LI XW, et al, 2013. Maternal inheritance of mitochondrial genomes and complex inheritance of chloroplast genomes in *Actinidia* Lind. : evidences from interspecific crosses [J]. *Mol Genet Genom*, 288(3-4): 101-110.
- LI JQ, HUAGN HW, SANG T, 2002. Molecular phylogeny and infrageneric classification of *Actinidia* (Actinidiaceae) [J]. *Syst Bot*, 27(2): 408-415.
- LIAO YH, 2011. A study on breeding system of two drug *glycyrrhiza* [D]. Shihezi: Shihezi University. [廖云海, 2011. 两种药用甘草繁育系统的研究 [D]. 石河子: 石河子大学.]
- LIU CS, WANG PY, WANG WQ, 2005. Study on circumscription of medicinal licorice species based on molecular biology [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 30(22): 16-18. [刘春生, 王朋义, 王文全, 2005. 中国药用甘草物种划分的分子基础研究 [J]. *中国中药杂志*, 30(22): 16-18.]
- LI XJ, WANG LY, YANG HL, et al, 2007. Confirmation of natural hybrids between *Gentiana straminea* and *G. siphonantha* (Gentianaceae) based on molecular evidence [J]. *Acta Bot Yunnan*, 29(1): 91-97. [李小娟, 王留阳, 杨惠玲, 等, 2007. 麻花苳和管花秦艽(龙胆科)之间自然杂交类型的分子验证 [J]. *云南植物研究*, 29(1): 91-97.]
- LI XL, LU JH, XIE LB, et al, 2015. Development of EST-SSR primers and genetic relationship analysis in four *Glycyrrhiza* L. species [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 35(3): 480-485. [李晓岚, 陆嘉惠, 谢良碧, 等, 2015. 4种甘草属植物 EST-SSR 引物开发及其亲缘关系分析 [J]. *西北植物学报*, 35(3): 480-485.]
- LI XY, 1993. A study of the system and new taxa of genus *Glycyrrhiza*. [J]. *Bull Bot Res*, 13(1): 13-43. [李学禹, 1993. 甘草属分类系统与新分类群的研究 [J]. *植物研究*, 13(1): 14-43.]
- LI XY, LU JH, 2015. Classification system and experimental biology of *Glycyrrhiza* L. [M]. Shanghai: Fudan University Press. [李学禹, 陆嘉惠, 2015. 甘草属(*Glycyrrhiza* L.) 分类系统与实验生物学研究 [M]. 上海: 复旦大学出版社.]
- LIU XL, HU SY, 1995. Study of generative cell development in *Pisum Sativum*-with special reference to cytological basis of plastid maternal inheritance [J]. *Acta Bot Sin*, 37(10): 749-753. [刘兴梁, 胡适宜, 1995. 豌豆生殖细胞的发育——着重论述质体母系遗传的细胞学基础 [J]. *植物学报*, 37(10): 749-753.]
- LIU XL, HU SY, WANG S, 1997. Cytological basis of plastid inheritance in *Phaseolus vulgaris*-investigations of plastids, mitochondria and their DNA nucleoids during pollen development [J]. *Acta Bot Sin*, 39(2): 106-110. [刘兴梁, 胡适宜, 王素, 1997. 菜豆花粉发育中质体和线粒体及其 DNA 存在的状况——着重阐明质体遗传的细胞学基础 [J]. *植物学报*, 39(2): 106-110.]
- LU JH, LI XY, MA M, et al, 2006. Analysis and classification of *Glycyrrhiza* L. plants in China by RAPD [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 26(3): 527-531. [陆嘉惠, 李学禹, 马森, 等, 2006. 国产甘草属植物的 RAPD 分析及其分类学研究 [J]. *西北植物学报*, 26(3): 527-531.]
- MASOUD SA, JOHNSON LB, SORENSEN EL, 1990. High transmission of paternal plastid DNA in alfalfa plants demonstrated by restriction fragment polymorphic analysis [J]. *Theor Appl Genet*, 79(1): 49-55.
- NEALE DB, SEDEROFF RR, 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine [J]. *Theor Appl Genet*, 77(2): 212-216.
- PARKER MC, 1934. Inheritance of a leaf variegation in the common bean [J]. *J Hered*, 4: 165-170.
- SCHUMANN CM, HANCOCK JF, 1989. Paternal inheritance of plastids in *Medicago sativa* [J]. *Theor Appl Genet*, 78(6): 863-866.
- STEINER KE, CRUZ BC, 2009. Hybridization between two oil-secreting orchids in South Africa [J]. *Plant Syst Evol*, 277(4): 233-243.
- TESTOLIN R, CIPRIANI G, 1997. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia* [J]. *Theor Appl Genet*, 94(7): 897-903.
- TIAN RW, LU JH, LI XY, et al, 2013. Diadelphous stamens in *glabra*: their development and adaptive significance [J]. *J Plant Ecol*, 37(7): 641-649. [田润炜, 陆嘉惠, 李学禹, 等, 2013. 光果甘草二体雄蕊的发育及其适应意义 [J]. *植物生态学报*, 37(7): 641-649.]
- TIAN X, LI DZ, 2002. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study [J]. *Acta Bot Yunnan*, 24(2): 170-184. [田欣, 李德铤, 2002. DNA 序列在植物系统学研究中的应用 [J]. *云南植物研究*, 24(2): 170-184.]
- WANG Y, SHANG H, GU YF, et al, 2015. A new cryptic hybrid species of *Adiantum* L. (Pteridaceae) identified by nuclear and chloroplast DNA sequences [J]. *Chin Sci Bull*, 60(10): 922-932. [王莹, 商辉, 顾钰峰, 等, 2015. 用核 DNA 和叶绿体 DNA 序列鉴别铁线蕨属 *Adiantum* L. (凤尾蕨科) 新的隐性杂交种 [J]. *科学通报*, 60(10): 922-932.]
- WU J, WAGN DC, YAGN YP, et al, 2015. Homoploid hybridization between native *Salix cavalieriei* and exotic *Salix matsudana* (Salicaceae) [J]. *Plant Divers Res*, 37(1): 1-10. [吴杰, 王东超, 杨永平, 等, 2015. 本地种云南柳与外来种旱柳(杨柳科)的同倍体自然杂交(英文) [J]. *植物分类与资源学报*, 37(1): 1-10.]
- XIE LB, LU JH, LI XL, et al, 2014. The cross compatibility and hybrid seed vigor among three *Glycyrrhiza* species [J]. *Plant Divers Res*, 36(3): 342-348. [谢良碧, 陆嘉惠, 李晓岚, 等, 2014. 三种甘草属植物的种间杂交亲和性及杂交种子活力 [J]. *植物分类与资源学报*, 36(3): 342-348.]
- XIU JJ, PAN L, PAN YZ, et al, 2014. Natural hybrids between *Ligularia vellea* and *L. subspicata* (Asteraceae: Senecioneae) [J]. *Plant Divers Res*, 2: 219-226. [余姣君, 潘莉, 潘跃芝, 等, 2014. 棉毛橐吾和穗序橐吾的自然杂交研究(英文) [J]. *植物分类与资源学报*, 2: 219-226.]
- YANG TW, YANG YA, XIONG Z, 2000. Paternal inheritance of chloroplast DNA in interspecific hybrids in the genus *Larrea* (Zygophyllaceae) [J]. *Am J Bot*, 87(10): 1452-1458.
- YAN R, 2009. Molecular evidence for nature hybridization and maternal origin of hybrids in *Hippophae* L. [D]. Lanzhou: Northwest Normal University. [严容, 2009. 沙棘属自然杂交种杂交起源及母本来源的分子证据 [D]. 兰州: 西北师范大学.]
- YANG W, QIU S, JING WL, et al, 2011. Identification of natural hybrid among *Pulsatilla* based on DNA sequences [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 31(9): 1738-1741. [杨威, 邱爽, 金武烈, 等, 2011. 基于 DNA 序列的白头翁属植物自然杂交证据 [J]. *西北植物学报* 31(9): 1738-1741.]
- ZHANG FM, 1995. The classification system and evolution of Chinese *Glycyrrhiza* L. [D]. Shihezi: Shihezi University. [张富民, 1995. 中国甘草分类系统与演化 [D]. 石河子: 石河子大学.]
- ZHANG PY, PENG ZX, 1960. Resource in northwest China-Licorice [J]. *J Lanzhou Univ (Nat Sci Ed)*, 6(1): 7-8. [张鹏云, (下转第 138 页 Continue on page 138)