

中国葱属系统发育的 PCR-RFLP 分析*

何兴金^{①**} 葛 颂^② 许介眉^① 洪德元^②

(^①四川大学生物系, 成都 610064; ^②中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

摘要 在综合形态分类和细胞分类的基础上, 从国产葱属的全部 9 个组中, 选择 18 个代表种(含外类群), 运用 PCR 方法, 分别扩增出 *trnK* 和 *rpL16* 两个叶绿体基因片段. 用 26 种限制性内切酶对其进行酶切分析, 共获得 303 个酶切变异位点, 其中 163 个为信息位点. 运用 PAUP(Version 3.1.1)等软件对所得数据分析表明: 葱属可以分为 6 个亚属级的分类阶元, 宽叶组的划分是合理的; 根茎组、单生组和洋葱组均是不自然的分类群, 属下组的划分应作相应调整. 对葱属属下分类系统进行了讨论.

关键词 中国葱属 分子系统发育 PCR-RFLP *trnK* 基因 *rpL16* 基因 属下系统

葱属(*Allium*)为广义百合科(Liliaceae)葱族(Allieae)的一个重要类群. 该属种类丰富、分布极广, 而关于它的属下系统及系统发育和进化问题尚存在不少分歧^[1]. 目前, 国内外学者对于葱属植物的种数尚无一致观点, 多数人认为大约有 700 多种^[2]. 同时属下分类系统也比较混乱, Regel^[3]将葱属分为 6 个组, 而最近的两个分类学修订^[2,4]都将该属处理为 6 个亚属. 许多学者的属下分类群的区别特征都是由一些细微的形态学差异组合而成的, 而这些特征在干标本上几乎无法观察到, 因此该属的分类学问题一直是一个难题^[5,6]. Linne 等人^[1]认为, 自 Regel 的形态系统发表以来, 新种报道不断, 但有关葱属的地理学、进化和亲缘关系及与之相关的属下分类问题涉及甚少, 仍存在许多空白. 80 年代以来, 分子生物学技术的飞速发展及其向植物分类学这门古老学科的渗透极大地推动了植物分类学的发展, 利用遗传物质本身研究植物类群间的系统发育关系, 已成为学科的生长点之一.

本文用 PCR 方法, 从葱属中扩增出长约 2 520 bp 的 *trnK* 基因和 1 230 bp 的 *rpL16* 基因. *trnK*(tRNA-Lys)基因和 *rpL16*(ribosomal protein L16)基因均为叶绿体基因, *trnK* 基因是叶绿体中 tRNA 基因, 代表携带 Lys 的 tRNA 基因, 同时在 *trnK* 基因的内显子中, 还含有一个 *matK* 基因, 编码一种参与 RNA 转录体中 II 型内含子的剪切作用的成熟酶. *rpL16* 基因编码核蛋白体大亚基多肽 L16. 在高等植物中叶绿体基因相对比较保守, 不像线粒体基因组那样发生频繁的重排事件, 也不像核基因组那样有较多的重复序列, 所以被广泛用于植物分子系统学研究中. Chase 等人^[7]利用 *rbcL* 基因序列对 499 种种子植物进行了系统发育重建, 其中包括百合科两属(*Lilium* 和 *Medeola*). Havey^[8]对 6 种葱属植物 45S rDNA 进行了 RFLP 分析, 同年又对

1999-02-12 收稿, 1999-06-21 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 39670053)、国家教育委员会博士点基金和中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室资助项目

** 现在中山大学生命科学学院做博士后工作, E-mail: lsdb03@zsu.edu.cn 或 hexingjin@263.net

10 种葱属植物的叶绿体 DNA 和 45S rDNA 进行了 RFLP 分析^[9], 为这几个种的系统发育提供了重要依据. Linne 等人^[1]对 48 种葱属植物叶绿体 DNA 进行 RFLP 分析, 为属下系统的建立提供了重要依据. Friesen 等人^[10]利用分子标记和核型学对葱属的异源四倍体种 *A. altynolicum* 的起源进行了探讨. Mes 等人^[6]用 PCR-RFLP 方法, 对 29 种葱属植物进行了分支分类处理, 并对该属的属下分类问题进行了讨论. 然而, 这些研究只涉及葱属的一部分类群, 尤其是遗漏了许多中国产类群, 对探讨整个葱属的系统发育仍有局限性. 本文运用 PCR-RFLP 方法对产于中国的葱属全部 9 组的代表种的两个 cpDNA 片段进行分析, 旨在探讨我国葱属属下系统的划分问题, 以期从分子水平对国产葱属的属下系统进行重建, 并且探讨其进化关系.

1 材料和方法

1.1 材料来源

我们在综合形态分类和细胞分类的基础上, 按《中国植物志》的分类处理^[11], 从产于我国的全部 9 个组中, 每组选择 1 或 2 个代表种, 并选取百合属(*Lilium*)和知母属(*Anemarrhena*)各一种为外类群. 供提取总 DNA 的试材均采自野外, 鲜叶严格按照居群取样, 每 1 g 鲜叶以 10 g 硅胶迅速干燥, 材料来源见表 1.

表 1 葱属植物来源

种名(组)		产地	凭证标本
大葱	<i>Allium victorialis</i> (Sect. <i>Anguinum</i>)	吉林, 敦化	图力古尔 91002
太白韭	<i>A. prattii</i> (Sect. <i>Anguinum</i>)	四川, 九龙	许介眉和何兴金 97-110
宽叶韭	<i>A. hookeri</i> (Sect. <i>Bromatorrhiza</i>)	四川, 峨眉山	许介眉 92-09
粗根韭	<i>A. fasciculatum</i> (Sect. <i>Bromatorrhiza</i>)	西藏, 达孜	土艳丽等 94-9
宽苞韭	<i>A. platyspathum</i> (Sect. <i>Rhizirideum</i>)	新疆, 天山	何兴金和张小亮 97628
高山韭	<i>A. sikkimense</i> (Sect. <i>Rhizirideum</i>)	四川, 九龙	许介眉和何兴金 97-107
葱	<i>A. fistulosum</i> (Sect. <i>Schoenoprasum</i>)	四川, 成都	何兴金 97-104
阿尔泰葱	<i>A. altaicum</i> (Sect. <i>Schoenoprasum</i>)	新疆, 布尔津	何兴金和张小亮 97643
洋葱	<i>A. cepa</i> (Sect. <i>Cepa</i>)	四川, 成都	何兴金 97-105
实茎葱	<i>A. galanthum</i> (Sect. <i>Cepa</i>)	新疆, 阿尔泰	何兴金和张小亮 97631
棱叶韭	<i>A. caeruleum</i> (Sect. <i>Haplostemon</i>)	新疆, 裕民	何兴金和张小亮 97609
小山蒜	<i>A. pallasii</i> (Sect. <i>Haplostemon</i>)	新疆, 额敏	何兴金和张小亮 97603
韭葱	<i>A. porrum</i> (Sect. <i>Porrum</i>)	新疆, 裕民	何兴金和张小亮 97613
蒜	<i>A. sativum</i> (Sect. <i>Porrum</i>)	四川, 成都	何兴金 97-101
合被韭	<i>A. tubiflorum</i> (Sect. <i>Caloscordum</i>)	陕西, 华山	崔铁城 1279
健韭	<i>A. robustum</i> (Sect. <i>Molium</i>)	新疆, 托里	何兴金和张小亮 97624
泸定百合	<i>Lilium sargentiae</i> (Outgroup)	四川, 都江堰	许介眉 97-106
知母	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (Outgroup)	内蒙古, 锡林浩特	何兴金和张小亮 97814

1.2 总 DNA 提取和浓度测定

总 DNA 提取采用 CTAB 法^[12]并作改进. 即将 0.3 g 干叶以液氮研磨后, 加入 1×CTAB 提取缓冲液中, 在 65℃温浴中摇 1 h, 取出后加 5 mol/L 的冰冷过的乙酸钾并在冰浴中静置 30 min, 其余步骤同 CTAB 法, 仅将 1 倍体积的 CTAB 沉淀 DNA 这一步骤改为 1 倍体积的异丙醇沉淀 DNA. DNA 浓度通过电泳-EB 染色荧光强度测定.

1.3 PCR 反应

扩增反应在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上进行, 反应总体积为 50 μL, 内含 50 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.3), 0.25 g/L 的 BSA, 2 mmol/L 的 MgCl₂, 1.5 U 的 Taq DNA 聚合酶(购自中国农

业大学), dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP 各 200 $\mu\text{mol/L}$, 40 ~ 50 ng 总 DNA, 引物 P_1 和 P_2 各 10 pmol. *rpL16* 基因的引物是根据紫萍属 *Spirodela oligorhiza* 的 *rpL16* 基因设计的^[13], 引物 P_1 的序列为 5' -GCTATGCTTAGTGTGTGACT-3', 位于 *S. oligorhiza* 的 71 ~ 90 bp 间, 引物 P_2 为 5' -GCTACCCATATTTTCCACC-3', 与 1 641 ~ 1 661 bp 同源, 片段长度为 1 251 bp. 扩增程序为: 70 $^{\circ}\text{C}$, 4 min $\rightarrow$ 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 53 $^{\circ}\text{C}$, 25 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 两个循环 $\rightarrow$ 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 53 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 38 个循环 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$, 6 min. *trnK* 基因的引物是按照水稻的 cpDNA 序列设计的, 位于水稻 cpDNA 序列的 1 413 ~ 3 972 之间, 其长度为 2 520 bp. 引物 P_3 的序列为 5' -AACCCGGGAAA-CTAGTCGGATG-3', 引物 P_4 的序列为 5' -GGTTGCTAACTCAATGGTAG-3', 我们在葱属中扩出了 2 520 bp 的 *trnK* 基因片段. 扩增程序为: 70 $^{\circ}\text{C}$, 4 min $\rightarrow$ 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 55 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 150 s; 循环 3 次 $\rightarrow$ 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 150 s; 循环 38 次 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$, 6 min $\rightarrow$ 25 $^{\circ}\text{C}$, 90 s.

1.4 限制性内切酶消化

实验选用 *Ava* II, *Bam* H I, *Bsp* H I, *Bst* B I, *Bst* N I, *Cla* I, *Dde* I, *Eco* R I, *Eco* R V, *Fok* I, *Hind* III, *Hha* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Kpn* I, *Nru* I, *Pst* I, *Rsa* I, *Sau* 3A I, *Sca* I, *Sma* I, *Ssp* I, *Sst* I, *Taq* I, *Xba* I, *Xho* I 共 26 种限制性内切酶, 对扩增出的两个基因进行酶切. 酶解反应体积为 20 μL , 内含 5 ~ 8 μL PCR 产物, 2 ~ 3 U 限制性内切酶和 1 $\times$ 限制性内切酶反应 buffer. 酶解反应时间为 2 ~ 2.5 h.

1.5 琼脂糖凝胶电泳

电泳在 1.5% ~ 2.0% 的琼脂糖凝胶中进行, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE. 电泳结束直接在 FOTODYNE 型紫外透射仪上照相.

1.6 数据分析

根据限制性内切酶位点的有无得到一个 1(位点存在)、0(位点不存在)数据矩阵, 然后用 PAUP3.1.1 软件^[14]分别采用 Wagner 简约法和 Dollo 简约法进行 branch-and-bound 和 Heuristic 搜索, 同时数据还用 MEGA^[15]软件中的 UPGMA 和 neighbor-joining(NJ)方法和 PHYLIP^[16]软件包中的 FITCH 和 UPGMG 等方法进行分析. 运用 PAUP 分析时, 分别用变异位点和信息位点(位点有和无中的每一状态至少被两个以上的分类群所共享)参与分析. 为进一步判断 Wagner 简约树和 Dollo 简约树中各分支的可信度, 采用了 Bootstrap 分析方法进行了检验. MEGA 软件分析中, 先将数据的 1, 0 状态换为两种碱基状态, 再以 P-distance 计算遗传距离. 因 P-distance 计算的是碱基替代的百分率, 因此, 所有的限制性内切酶位点均参与分析. PHYLIP 软件则直接用 1, 0 状态或换为碱基两种方式分析.

2 实验结果

由引物 P_1 和引物 P_2 扩增出的 *rpL16* 基因, 在葱属植物中无长度差异, 均长约 1 230 bp; 引物 P_3 和引物 P_4 扩出的 *trnK* 基因片段, 均长约 2 520 bp. 各群的两个扩增片段分别用前述的 26 种限制性内切酶进行酶切, 结果下列 15 种酶对 *rpL16* 基因产生了有变异的酶切位点: *Bam* H I, *Bst* N I, *Dde* I, *Eco* R I, *Fok* I, *Hha* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Nru* I, *Rsa* I, *Sau* 3A I, *Ssp* I, *Sst* I, *Taq* I, *Xba* I (图 1). 下列 18 种酶在 *trnK* 基因上产生了有变异的酶切位点: *Bam* H I, *Bsp* H I, *Bst* B I, *Bst* N I, *Cla* I, *Dde* I, *Eco* R I, *Eco* R V, *Fok* I, *Hha* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Kpn* I, *Rsa* I, *Sau* 3A I, *Ssp* I, *Sst* I, *Taq* I. 在两个基因片段上共得到 303 个酶切变异位点, 其中 163 个为

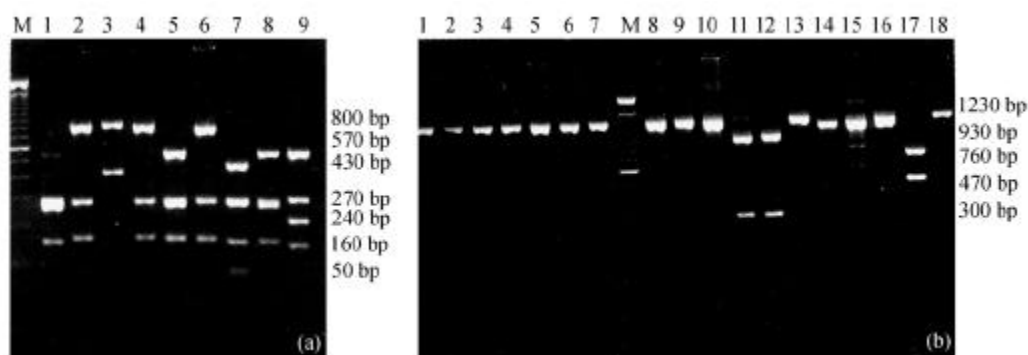


图 1 内切酶 *Taq* I 对 *rpL16* 基因酶切(a)及内切酶 *Hha* I 对 *rpL16* 基因酶切(b)

(a)中 1 为苍葱, 2 为宽叶韭, 3 为高山韭, 4 为阿尔泰葱, 5 为实葶葱, 6 为棱叶韭, 7 为蒜, 8 为合被韭, 9 为知母; (b)中 1 为苍葱, 2 为太白韭, 3 为宽叶韭, 4 为粗根韭, 5 为宽苞韭, 6 为高山韭, 7 为葱, 8 为阿尔泰葱, 9 为洋葱, 10 为实葶葱, 11 为韭葱, 12 为蒜, 13 为棱叶韭, 14 为小山蒜, 15 为合被韭, 16 为健韭, 17 为泸定百合, 18 为知母

信息位点。数据矩阵用 PAUP 的连续加权法(successive weighting)处理后, 再用 branch-and-bound 法分析得到 1 个最简约树, 而用 heuristic 方法得到 3 个 Wagner 简约树, 但其严格一致树的分支式样与 branch-and-bound 的结果一样。数据矩阵运用连续加权法处理后, 根据 Dollo 简约原则, 运用 branch-and-bound 和 heuristic 方法分析, 均得到一个简约树(图 2), 且完全一致。运用 Bootstrap 检验法对数据进行 1 000 次重抽样分析, 其结果强烈支持各个分支(见图 2 中分支上的数字)。用 NJ 和 UPGMA 方法从 MEGA 中所得的系统树(图 3, 4)在拓扑学上与 Wagner 简约树和 Dollo 简约树基本一致。运用 PHYLIP 软件包中的 FITCH 和 UPGMA 得到的 NT 树也与上述结果基本一致(其分支系统树略)。

3 讨论

3.1 属下组的划分问题

按照 Hanelt 等人^[2]的系统, 我国葱属植物可以分为 5 个亚属 17 个组。《中国植物志》^[11]将我国葱属植物分为 9 个组。本文研究结果表明, 在 9 个组中, 宽叶组(图 2-I)、粗根组(图 2-II)、葱组(图 2-IV)和长齿组(图 2-VII)的划分比较合理, 它们组下成员均各自分别形成单系群, 且得到 Bootstrap 的强烈支持(支持率高达 94%~100%)。表现出明显不自然的组有根茎组(图 2-III)和单生组(图 2-VI)。根茎组的两个类群被分在了不同的两个大的分支中, 不是一个单系群。根据我们最近的细胞学研究(另文发表), 该组中的染色体基数为 $X = 8$, 但在核型类型、倍性、随体染色体和 B 染色体等方面差异明显, 表明核型水平的变异与叶绿体基因变异相互印证, 反映出该组具根茎这一形态特征是次生衍征, 故仅以根茎的有无这一特征所划分的根茎组是不自然的。这一结果与 Mes 等人^[6]的推论不谋而合。单生组(图 2-VI)的 2 个类群被分在了两个不同的较高级的分支中, 也不是一个单系群, 两者形态相似、细胞学上的染色体基数相同, 但在核型类型、倍性和随体染色体的形态存在明显差异, 因此, 单生组的建立是不自然的。洋葱组(图 2-V)的两个成员分在一个较高级分支的两端(图 2-V), 表明它们虽有一定的亲缘关系, 但放于一个组中是否恰当尚有待其他分支学科的证据。

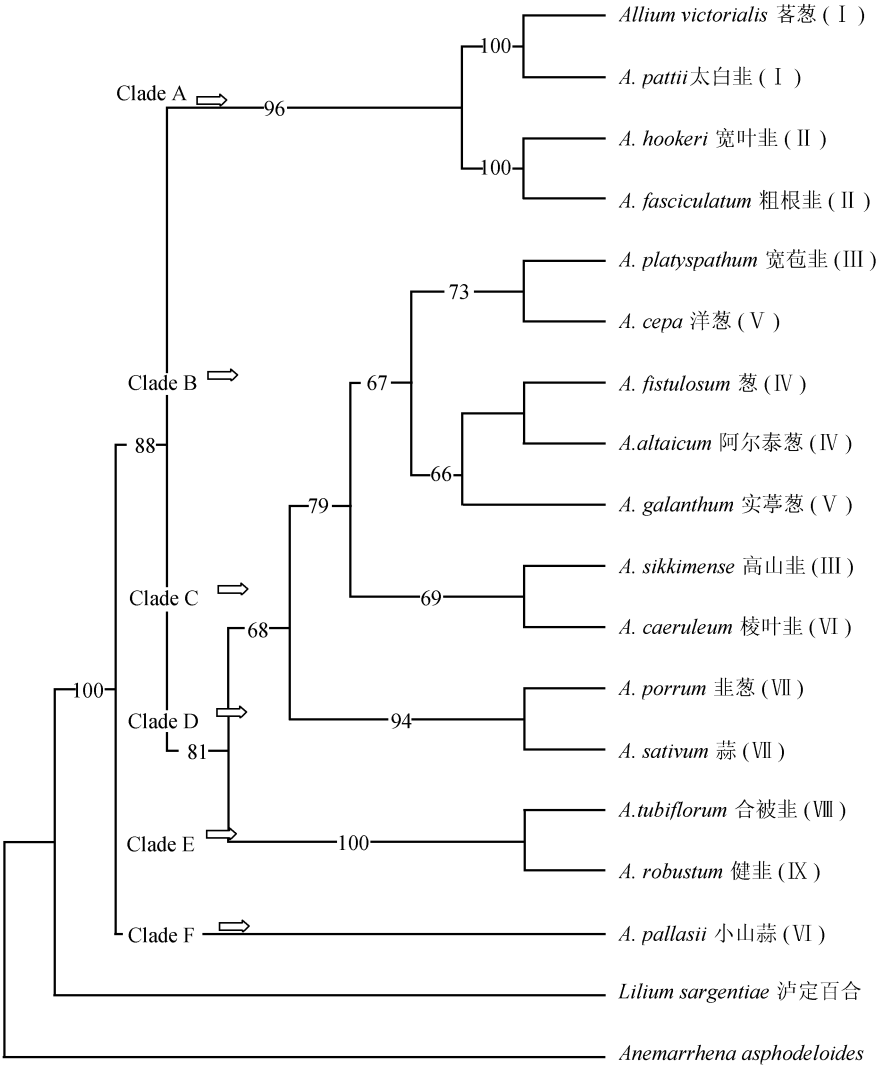


图 2 基于 *rpL16* 和 *trnK* 基因(163 个信息位点)构建的大于 50%原则最简约 Dollen 严格一致树 树长 179 819(用连续性加权法, 权重为 1 000), CI = 0.705, RI = 0.851. 计算机 1 000 次重抽样自检率(Bootstrap)值 标在分支图上. I 为宽叶组, II 为粗根组, III 为根茎组, IV 为葱组, V 为洋葱组, VI 为单生组, VII 为长齿组, VIII 为 合被组, IX 为多籽组

3.2 组间及种间亲缘关系

本文的 PCR-RFLP 分析结果表明, 宽苞韭(根茎组)与洋葱(洋葱组)、高山韭(根茎组)与棱 叶韭(单生组)近缘, 而实葶葱(洋葱组)与阿尔泰葱(葱组)有较近的亲缘关系. 将 MEGA 中的 MP 树与 PAUP 中所得的 Dollo 和 Wagner 简约树进行比较, 在这几个类群的分支上所表现出的亲 缘关系基本一致, 而 MEGA 中的 NJ 树和 UPGMA 树中, 根茎组的宽苞韭却与葱组的葱和阿 尔泰葱近缘, 洋葱组的洋葱与单生组的小山蒜近缘, 根茎组的高山韭与单生组的棱叶韭近缘 (图 3 和 4); 这说明宽苞韭、实葶葱、洋葱和小山蒜这几个种在分支分类上的位置是变动的. 在

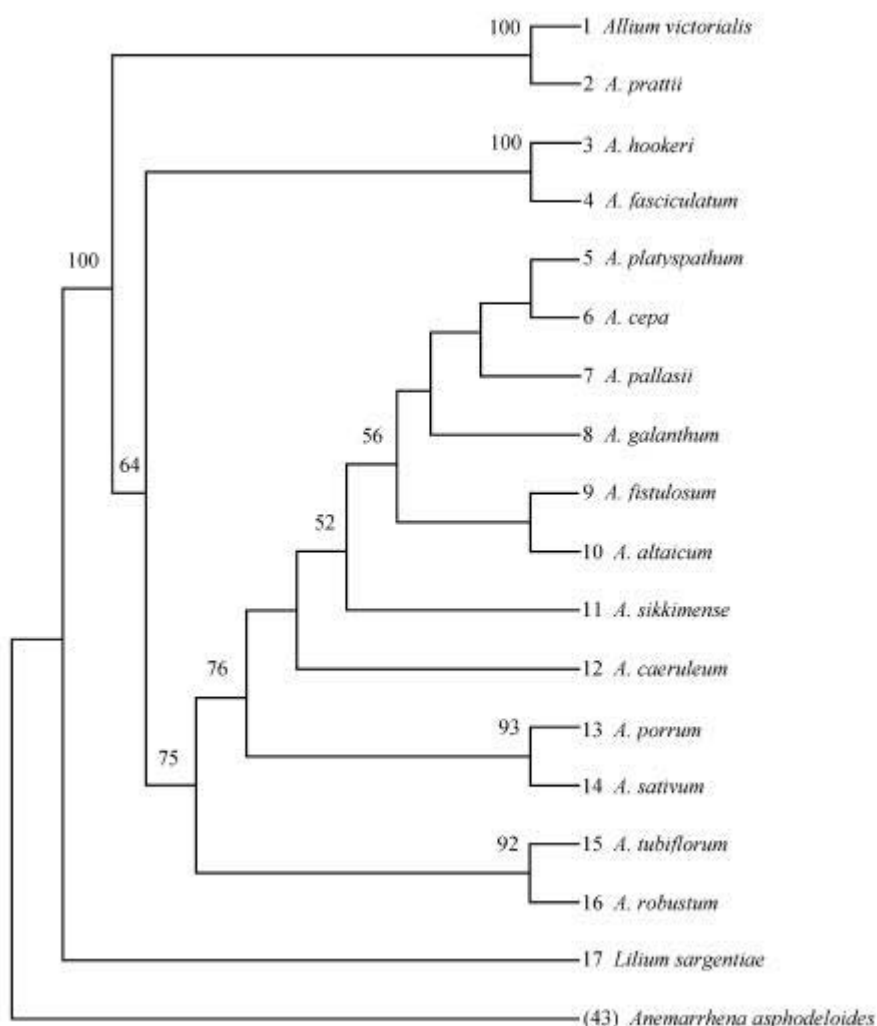


图 3 分子进化的遗传分析软件(MEGA)算得的邻接(neighbor-joining)树
计算机 1 000 次重抽样自检率(Bootstrap)值标在分支图上

形态上,这几个种无论在鳞茎、叶形、总苞和花序上都有明显差异,而本文的 PCR-RFLP 分析中,这几个种的位置的变动,说明仅仅以这两个叶绿体基因尚难确定其系统位置.至于高山韭与棱叶韭近缘,在各个软件分析中得到的结果基本一致,但形态上两者在鳞茎、叶形、植株形态等相差甚远.造成这些类群在形态和分子等水平上进化不协调的原因,尚有待进一步研究. Mes 等人^[6]对 *Amerallium* 亚属研究结果表明该亚属成员的系统位置难以确定,且该亚属在形态上是多变的,他们认为造成形态分类和叶绿体基因变异不协调的原因之一可能是该属存在着网状进化^[2],而解决网状进化和叶绿体基因突变等问题的最好方法是增加所研究基因的数目,尤其是单拷贝核基因研究.尽管这 5 个种的相互关系上存在上述问题,但它们却共同组成一个高于组一级分类阶元的单系群,因此这 5 个种可以组成亚属级的分类阶元(图 2 中 Clade B).

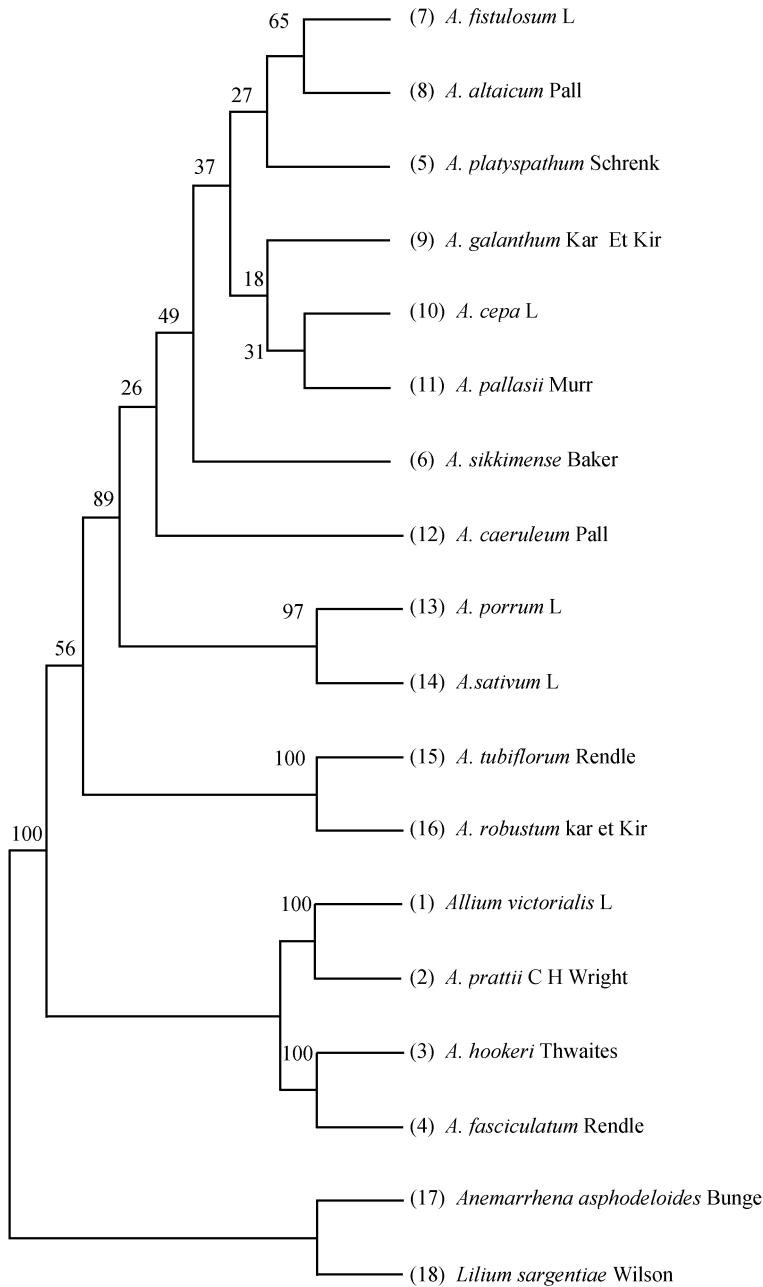


图 4 分子进化的遗传分析软件(MEGA)算得的简单成聚(UPGMA)树
计算机 1 000 次重抽样自检率(Bootstrap)值标在分支图上

棱叶韭和小山蒜，它们在形态学上因鳞茎单生、近球形、子房每室 2 胚珠等形态特征被放于单生组(图 2-VI)中；但在本研究的各软件处理后的分支分析图中，却被远远地分开，棱叶韭与根茎组的高山韭近缘，而小山蒜却与葱组和洋葱组近缘。核型上小山蒜为 $2n = 2x = 16 = 16m$ (2 SAT)为 1A 型核型，而棱叶韭则在不同居群间出现 $2n = 16, 24, 32$ 的多倍体变异，且

二倍体的核型为 $2n = 2x = 16 = 14m + 2sm(2SAT)$ 属 2A 型核型。造成棱叶韭与小山蒜在形态上相似而细胞和分子水平上差异明显的原因很可能是形态上趋同演化的结果, 但这一推断尚有待进一步增加核基因分析后证实。

关于合被组的合被韭与多籽组的健韭这两个种的亲缘关系, Hanelt 等人^[2]将合被组提升为合被亚属(*Subgenus Caloscordum*)且仅含一个组即合被组, 而将多籽组放于 *Amerallium* Traub 亚属中。《中国植物志》^[11]因两者花被片基部是否合生而被分别放于合被组(*Sect. Caloscordum*)和多籽组(*Sect. Molium*)中。本研究表明, 这两个分类群为一个亲缘关系紧密的单系群。我们对中国葱属的花粉形态观察结果表明, 这两个组的外壁纹饰上, 多籽组为条纹, 而合被组为条纹-孔网纹, 在该属中条纹-孔网纹是由条纹进化来的, 表明两者具有较近的亲缘关系。进一步的形态学分析同样支持这一结果, 因为这两个类群每个子房室中均有 4 个以上胚珠, 这说明每子房室中的胚珠数多于 4 个这一特征是这两个植物类群的共有衍征, 而花被合生这一特征则是合被韭的自征, 因此两者组成一个亚属, 其下再分两组似乎较为合理。

3.3 属下系统处理

由于葱属的属下分类群的界限无一个统一标准, 从而导致组的数目不断增加^[6]。再加上缺乏明显的总体形态学共有衍征, 因而亚属等的划分都具有很强的人为性^[10]。Hanelt 等人^[2]主要根据形态特征, 同时兼顾一些解剖学、地理学和细胞学特征, 将世界葱属分为 6 个亚属, 46 个组和 11 个亚组。《中国植物志》^[11]将我国葱属植物分为 9 个组(其隶属关系见图 2 说明)。宽苞韭与高山韭(根茎组, 图 2-I)、洋葱与实荪葱(洋葱组, 图 2-V)、葱与阿尔泰葱(葱组, 图 2-IV)因鳞茎的形态和根茎的有无, 叶形以及花丝全缘与否, 小苞片的有无, 分别将它们放于 3 个不同的组中。但本文两个 cpDNA 基因片段的 RFLP 分析表明, 这几个种中, 除高山韭外, 其余 5 个种为一个亲缘关系较紧密的单系群。这一结论得到了我们对中国葱植物花粉形态和种子微形态研究结果的支持(另文发表)。因此, 从本文的 PCR-RFLP 分析结果表明, 中国葱属植物可以分为 6 个亚属(见图中的较高级分支, Clade A ~ F)即: 亚属 A 包括原形态分类处理中的宽叶组和粗根组(图 2-I, II, Clade A), 亚属 B 包括原葱组和洋葱组及宽苞韭(图 2-IV, V, Clade B), 亚属 C 包括高山韭和棱叶韭(图 2-IV, V, Clade C), 亚属 D 为原来的长齿组(图 2-VII, Clade D), 亚属 E 包括原来的合被组和多籽组(图 2-VIII, IX, Clade E), 亚属 F 包括小山蒜等(图 2, Clade F)。我们建议对中国葱属的属下系统作相应的修订。

参 考 文 献

- 1 Linne von B G, Samoylov A, Klaas M, et al. Chloroplast DNA restriction analysis and the infrageneric grouping of *Allium* (Alliaceae). *Plant Syst Evol*, 1996, 200: 253 ~ 261
- 2 Hanelt P, Schulze-motel J, Fritsch R M, et al. Infrageneric grouping of *Allium*—— the Gatersleben approach. In: Hanelt P, Hammer K, Knupffer H, eds. *The Genus Allium —— Taxonomic Problems and Genetic Resources*. Gatersleben: Germany Institute of Genetics and Crop Plant Research, 1992. 107 ~ 123
- 3 Regel E. *Alliorum*. *Monographia Acta Horti Petropolythanii*, 1875, 3: 1 ~ 266
- 4 Kamelin R V. *Florogeneticeskij Analiz Estestvennoj Flory Gornoj Sreknjej Azii*. Lenigrad: Nauka, 1973
- 5 Traub H. The subgenera, sections and subsections of *Allium* L. *Plant Life*, 1968, 24: 147 ~ 163
- 6 Mes H M, Friesen N, Fritsch R M, et al. Criteria for Sampling in *Allium* based on chloroplast DNA PCR-RFLP' s. *Systematic Botany*, 1997, 22(4): 701 ~ 712

- 7 Chase M W, Soltis D E, Olmstead R G, et al. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Missouri Bot Gard*, 1993, 80: 528 ~ 580
- 8 Havey M J. Restriction enzyme analysis of the nuclear 45S ribosomal DNA of six cultivated *Allium* (Alliaceae). *Pl Syst Evol*, 1992, 181: 45 ~ 55
- 9 Havey M J. Restriction enzyme analysis of the chloroplast and nuclear 45S ribosomal DNA of *Allium* Sections *Cepa* and *Phyllodolon* (Alliaceae). *Pl Syst Evol*, 1992, 183: 17 ~ 31
- 10 Friesen N, Borisjuk N, Mes H M, et al. Allotetraploid origin of *Allium altynolicum* (Alliaceae, *Allium* Sect. *Schoenoprasum*) as investigated by karyological and molecular markers. *Pl Syst Evol*, 1997, 206: 317 ~ 335
- 11 许介眉. 中国植物志, 第 14 卷. 北京: 科学出版社, 1980
- 12 Murray M, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acide Res*, 1980, 8: 4 321 ~ 4 325
- 13 Jordan W C, Courtney M W, Neigel J E. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American Duckweeds (Lemnaceae). *Amer J Bot*, 1996, 83(4): 430 ~ 439
- 14 Swofford D L. PAUP: Phyloenetis Analysis Using Parsimony, Version 3.1.1. Computer Software. Champaign : Illinois Natural History Survey, 1993
- 15 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.01. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Park, 1987
- 16 Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package, Version 3.57c. Washington: The University of Washington, 1995