

美人蕉种质资源的 RAPD 分析

黄国涛¹ 欧阳底梅² 向其柏¹ 朱伟华² 张寿洲³

(¹ 南京林业大学风景园林学院, 南京 210037; ² 深圳市城市绿化管理处, 深圳 518035; ³ 深圳市仙湖植物园, 深圳 518004)

摘要: 利用 RAPD 技术对美人蕉属 4 个种和 52 个品种的亲缘关系进行研究, 从 125 个随机引物中筛选出 27 个多态性较高的引物, 扩增出 223 条 DNA 带, 其中 140 条为多态带, 占 62.78%, 平均每个引物扩增的 DNA 带数为 8.26 条。3 个种和 7 个品种具有特异的位点, 可作为种质鉴定的依据。根据 RAPD 扩增结果建立美人蕉 UPGMA 聚类图, 在 0.11 处将 56 份种质划分为 4 类。分子聚类结果与形态分类结果基本一致, 4 个种分属 4 个类群, 52 个品种分为大花美人蕉和兰花美人蕉。对美人蕉品种分类和品种演化进行了初步探讨。

关键词: 美人蕉属; RAPD; 分类; 亲缘关系

中图分类号: S 682.2⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 02-0273-05

RAPD Analysis of Germplasm Resources on Canna

Huang Guotao¹, Ouyang Dimei², Xiang Qibai¹, Zhu Weihua², and Zhang Shouzhou³

(¹ College of Landscape, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; ² Shenzhen Urban Garden Administration, Shenzhen 518035, China; ³ Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen 518004, China)

Abstract: Taxonomy of four *Canna* species and 52 cultivars were analyzed using random amplified polymorphic DNA. 27 primers were screened from 125 arbitrary 10-mer primers, and a total of 223 DNA bands were amplified, 140 of which (62.78%) were polymorphic. The average numbers of DNA bands amplified by each primer were 8.26. There were specific amplified bands in three species and seven cultivars, and these bands can be used in *Canna* germplasm identification. The dendrogram constructed by UPGMA showed that the 56 individuals were classified into four groups. Four species were grouped independently and 52 cultivars were classified into *Canna* *×* *generalis* Bailey and *C. ×* *orchoides* Bailey. This conclusion consisted with the traditional *Canna* taxonomy. Phylogenetic relationship of *Canna* germplasm was also discussed.

Key words: *Canna* Linn.; RAPD; Taxonomy; Phylogenetic relationship

美人蕉属 (*Canna* Linn.) 是美人蕉科 (Cannaceae) 的单一属, 约 25~60 种^[1~4]。该属植物大部分原产美洲热带和亚热带地区, 个别种原产亚洲和非洲, 现已广泛分布于世界热带和温带地区。由于美人蕉容易种间杂交, 在长期人工培育下形成大量的新品种及中间类型, 种的界限不清楚, 给花卉品种整理和研究带来困难。目前, 美人蕉种一级分类存在“大种”和“小种”两种观点, 争议较大^[1,5]; 杂种美人蕉品种分为大花美人蕉 (*Canna* *×* *generalis* Bailey) 和兰花美人蕉 (*C. ×* *orchoides* Bailey), 但由于品种数量多, 品种形态多变, 一些品种形态特征介于两者之间, 因此形态分类存在一定的困难^[6,7]。利用分子生物学手段将它们系统地进行分类研究, 国内外尚未见报道。

一些与美人蕉科亲缘关系较近的植物如芭蕉属 (*Musa*)、赫蕉属 (*Heliconia*) 等也运用此技术进行了系统分类和品种鉴定研究, 补充和改进了形态分类研究的不足^[8,9]。本试验用 RAPD 分子标记研究美人蕉分类, 为其起源、品种鉴定及优良品种的选育提供科学理论依据。

收稿日期: 2004-07-01; 修回日期: 2004-10-22

1 材料与方法

1.1 材料

56份种质包括中国 4种、14品种, 英国 25品种, 泰国 13品种, 保存于深圳城市绿化管理处沙河苗木场。其中美人蕉 (*C. indica* L.) 和蕉芋 (*C. edulis* Ker.) 分别采自海南儋州和广东阳江, 柔瓣美人蕉 (*C. flaccida* Salisb.), 粉美人蕉 (*C. glauca* L.) 采自广州, 根据瓣化雄蕊宽度、颜色和叶片形态, 对照文献和图片资料确定种类^[3,4,10]。各种质主要性状见表 1。

表 1 供试材料编号和主要性状

Table 1 List of samples used for RAPD analysis

编 号	种名或品种名	花色	叶色	株高	编 号	种名或品种名	花色	叶色	株高
No	Species or cultivar name	Flower color	Foliage color	Height	No	Species or cultivar name	Flower color	Foliage color	Height
1	美人蕉 <i>Canna indica</i> L.	红 Red	绿 Green	高 Tall	29	Corrida	红 Red	绿 Green	矮 Dwarf
2	蕉芋 <i>C. edulis</i> Ker	红 Red	紫 Purple	高 Tall	30	Tropical Sunrise	粉 Pink	绿 Green	中 Medium
3	粉美人蕉 <i>C. glauca</i> L.	黄 Yellow	粉绿 Glauous	高 Tall	31	Pfitzer's Cherry Red	深红 Deep red	绿 Green	中 Medium
4	柔瓣美人蕉 <i>C. flaccida</i> Salisb	黄 Yellow	绿 Green	中 Medium	32	Rosamond Coles	橙红 Orange	绿 Green	中 Medium
5	Champion	粉 Pink	紫 Purple	中 Medium	33	C. F. Cole	黄红点 Yellow, red po	绿 Green	中 Medium
6	En Avant	黄 Yellow	绿 Green	中 Medium	34	Cleopatra	红黄复色 Red yellow	紫绿 Green purple	高 Tall
7	Prince Chamant	粉 Pink	绿 Green	高 Tall	35	大花面 Dahuanian	红黄杂色 Red yellow	绿 Green	中 Medium
8	Oiseau D'or	黄 Yellow	绿 Green	中 Medium	36	泰国橙红 Taiguochenghong	橙红 Orange	绿 Green	中 Medium
9	Roi Soleil	深红 Crimson	绿 Green	中 Medium	37	喷点紫红 Pendianzihong	紫红 Purpleish red	绿 Green	中 Medium
10	Gnom	橙红 Orange	绿 Green	矮 Dwarf	38	小花淡黄 Xiaohuadanhuang	淡黄 Buff	绿 Green	中 Medium
11	Montagne	红 Red	紫 Purple	中 Medium	39	柔瓣紫红 Roubanzihong	紫红 Purpleish red	绿 Green	中 Medium
12	Centenaire	粉 Pink	绿 Green	中 Medium	40	垂花艳红 Chuihuayanhong	红 Red	绿 Green	中 Medium
13	Oiseau de feu	红 Red	绿 Green	中 Medium	41	小花黄 Xiaohuahuang	黄 Yellow	绿 Green	中 Medium
14	Assaut	红 Red	紫 Purple	高 Tall	42	粉叶小玫红 Fenyexiaomeihong	红 Red	粉绿 Glauous	中 Medium
15	Talisman	黄 Yellow	绿 Green	中 Medium	43	绿叶矮红 Luyeahong	红 Red	绿 Green	矮 Dwarf
16	Magique	红 Red	紫 Purple	中 Medium	44	印丽 Yinli	红 Red	绿 Green	高 Tall
17	Camaval	黄 Yellow	绿 Green	中 Medium	45	紫叶橙红 Ziyechenghong	橙红 Orange	紫 Purple	高 Tall
18	Jivago	橙红 Orange	绿 Green	中 Medium	46	铁十字 Tieshizi	红 Red	绿 Green	矮 Dwarf
19	Tafrtout	粉 Pink	绿 Green	矮 Dwarf	47	二乔 Erqiao	红黄复色 Red yellow	紫绿 Green red	中 Medium
20	Tchad	红 Red	紫 Purple	高 Tall	48	垂花橙黄 Chuihuachenghuang	橙红 Orange	绿 Green	高 Tall
21	La Quiniinie	橙红 Orange	紫 Purple	中 Medium	49	Florence Vaughan	黄 Yellow	绿 Green	中 Medium
22	Corail	红 Red	紫 Purple	矮 Dwarf	50	中花面 Zhonghuamian	红黄杂色 Red yellow	绿 Green	矮 Dwarf
23	Liberte	橙黄 Orange	紫 Purple	高 Tall	51	总统 President	红 Red	绿 Green	中 Medium
24	Picadore	红 Red	绿 Green	中 Medium	52	红花二乔 Honghuaerqiao	红 Red	紫 Purple	中 Medium
25	Extase	橙红 Orange	绿 Green	中 Medium	53	优丽 Eureka	淡黄 Pale yellow	绿 Green	矮 Dwarf
26	Cabarello	黄 Yellow	绿 Green	矮 Dwarf	54	绿叶红 Lüyehong	红 Red	绿 Green	高 Tall
27	Triomphe	红 Red	紫 Purple	中 Medium	55	小花橙 Xiaohuacheng	橙红 Orange	绿 Green	中 Medium
28	Stasbourg	红 Red	绿 Green	中 Medium	56	金脉 Pretoria	橙红 Orange	黄绿 Green yellow	中 Medium

注: 1~4, 43~56收集自中国; 5~29收集自英国; 30~42收集自泰国。

Note: 1 - 4, 43 - 56 were collected from China; 5 - 29 from England; 30 - 42 from Thailand

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取和浓度测定 DNA提取按 2 ×CTAB 法^[11]。DNA浓度采用紫外分光光度计测定。

1.2.2 PCR扩增 对购自 Sangon公司的 125个 10碱基随机引物进行了筛选, 从中选取扩增条带清晰、重复性较好的 27个引物用于 PCR扩增。PCR反应体系总体积为 25 μL, 其中无菌双蒸水 16.2 μL, 10 ×buffer (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 27.5 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL, 模板 DNA (20~30 ng/μL) 2 μL, 1 mmol/L dNTPs 2 μL, 8 pmol/L primer 2 μL, 1.5 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序: 94 180 s, 1个循环; 94 60 s, 37 90 s, 72 90 s, 42个循环; 最后, 72 延伸 10 min。热盖温度设置为 105 。

1.2.3 电泳检测 PCR扩增产物在 4 V/cm恒压条件下, 于 1.5%琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL溴化乙啶) 中电泳 3 h。以 100 bp DNA ladder Plus (100~3000 bp, Fementas公司) 作为相对分子质量标准。

电泳后于凝胶成像系统观察与照相。

1.2.4 数据分析 对照分子量标记,确定反应产物的分子量。强带记为“1”,重现性差的弱带及无反应带记为“0”,得到原始数据。采用 MEGA 程序中的 $p\text{-distance}$ 公式计算遗传距离,根据 UPGMA 法进行聚类分析,作出系统聚类图^[12]。

2 结果与分析

2.1 DNA 扩增结果

采用 S1、S25、S43、S51、S53、S55、S61、S78、S81、S82、S109、S110、S114、S116、S117、S123、S161、S163、S173、S181、S184、S191、S194、S203、S205、S212、S214 等 27 条随机引物,对 56 份种质总 DNA 进行 RAPD 扩增。共扩增出 223 条 DNA 带,其中,多态性 DNA 带 140 条,占总带数的 62.78%,单条引物扩增带数目为 4~16 条,平均 8.26 条。扩增产物长度介于 250~1500 bp,以 500~800 bp 的扩增片段居多。S1 引物扩增的 RAPD 图谱如图 1。

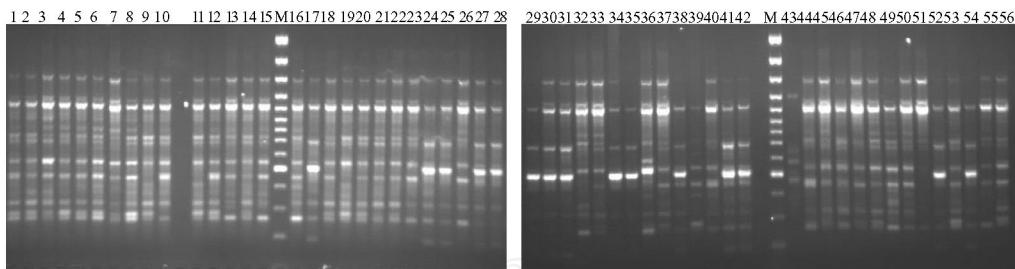


图 1 引物 S1 的 RAPD 扩增结果

1~56. 不同材料的编号,详见表 1; M. Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus

Fig 1 The RAPD profile generated with the primer S1

1 - 56. The number of materials, see Table 1; M. Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus

2.2 部分美人蕉种质特有 RAPD 标记

56 份材料中,柔瓣美人蕉在 S116 - 650 bp 处、蕉芋在 S55 - 600 bp 处有特异扩增带;柔瓣美人蕉和兰花美人蕉的‘印丽’、‘垂花橙黄’、‘Liberte’等 11 个品种在 S163 - 400 bp 处有扩增产物,而其他材料都无扩增。除特异性产物外,还可观察到特异性缺失条带,如美人蕉在 S123 - 350 bp 处、‘Magique’在 S161 - 400 bp 处、‘柔瓣紫红’在 S51 - 250 bp 处、‘铁十字’在 S61 - 400 bp 处缺失条带。这些特异性扩增带和特有缺失带可作为美人蕉种质鉴定的重要依据。

2.3 种质亲缘关系分析

56 份种质 UPGMA 聚类结果见图 2,种质间平均遗传距离为 0.198。在树状图 0.11 处,56 份种质聚成 4 类。第 1 类只有 1 个种,即美人蕉。第 2 类包括 1 个种 11 品种,除‘金脉’、‘二乔’、‘红花二乔’外,这些品种的形态特征属于杂种美人蕉的兰花美人蕉^[6]。该类可进一步分为两个亚类,第 1 亚类包括柔瓣美人蕉 1 个种和‘绿叶红’、‘金脉’、‘垂花橙黄’、‘Florence Vaughan’、‘二乔’、‘红花二乔’、‘柔瓣紫红’及‘Cleopatra’等 8 个品种,这一亚类花色较多,有红色、橙色、黄色及红黄复色等;第 2 亚类包括‘印丽’、‘紫叶橙红’和‘Liberte’3 个品种,这一亚类花色为橙红或深红。第 3 类只有蕉芋 1 个种,该种花红色,花小,观赏价值不高,但其根茎可食,是中国华南地区及东南亚各国常见的杂粮作物。第 4 类包括粉美人蕉 1 个种和 41 个品种,其中 41 个品种的花色、花型变化多样,形态上属于杂种美人蕉类的大花美人蕉。第 4 类可进一步分为 4 个亚类:第 1、2 亚类均只有 1 个品种,分别是‘垂花艳红’和‘Tropical Sunrise’;第 3 亚类包括有粉美人蕉 1 个种和‘粉叶小玫红’、‘小花黄’、‘C. F. Cole’、‘小花淡黄’等 4 个品种,这一亚类的形态特征与粉美人蕉一些特征很相似,如花茎小、黄花、粉叶等;第 4 亚类包括‘Montagne’、‘Centenaire’和‘Oiseau de feu’等 35 个品种,这个亚类类群最大,种质间距离系数小,但是种质间外部形态差别较大,花色

丰富,从红色到黄色及混色、相嵌等均有,有些品种花朵还带有金边或斑点,花型有唐菖蒲型、鸢尾型等,叶色有绿叶、粉叶和紫叶。

3 讨论

3.1 美人蕉种质的分类

对供试美人蕉种质聚类图中各类群形态特征进行对比分析,发现第2聚类群大部分品种花少,花冠管长(长约2 cm),花瓣在开放后即反折,而瓣化雄蕊通常柔软下垂;第4聚类群的品种花多,花冠管短(<1 cm),花瓣直立,瓣化雄蕊少见下垂。这一聚类结果与按花的数量、花瓣及瓣化雄蕊等形态特征分类的结果基本一致,因此形态特征和 RAPD 标记都可将供试的大部分品种分为兰花美人蕉和大花美人蕉两个杂交种。第2聚类的‘金脉’、‘二乔’和‘红花二乔’3个品种,除花径、瓣化雄蕊等特征与兰花美人蕉相似外,其它形态介于两者之间,如花管长中等,花瓣反折或不反折,过去这些品种被归为大花美人蕉,本研究结果表明,‘金脉’、‘二乔’、‘红花二乔’与兰花美人蕉各品种聚在一起,亲缘关系密切,因此将该3个品种归类为兰花美人蕉更能反映真实的分类关系。

在大花美人蕉类群中,各品种聚类关系与形态特征的相关性较小,如在第4亚类的‘Montagne’、‘Centenaire’、‘Oiseau de feu’等35个品种,并没有按照叶色、株高、花色、花的大小等外部形态特征分开聚类。这表明,在大花美人蕉类群中,由于种质间杂交容易,经过长期频繁的杂交育种,各小类群的遗传物质互相渗入,导致分子聚类结果与外部形态特征的相关性变得模糊,因此,仅根据外部形态特征并不能完全反映大花美人蕉品种间的亲缘关系。

在种一级分类上,传统分类在美人蕉这个种上存在较大争议, KRÄNZL N 等认为美人蕉、蕉芋、紫叶美人蕉等形态性状稳定,应各自分开;而 Maas 等则认为蕉芋、紫叶美人蕉等多个种均是美人蕉的变种或品种,属于同物异名,应予合并^[1]。本试验结果表明,在树状图 0.11 处,美人蕉、柔瓣美人蕉、蕉芋和粉美人蕉分属不同的聚类群,因此,分子水平的分类结果仍支持蕉芋应分在种一级上。

3.2 美人蕉品种演化的探讨

杂交育种是培育美人蕉新品种的主要途径之一,从 1848 年至今,通过杂交共培育出几千个美人蕉品种,现存约 1 000 多个。目前,一致认为杂种美人蕉分为 2 个园艺杂交种,大花美人蕉和兰花美人蕉。大花美人蕉原始亲本为美人蕉、粉美人蕉、鸢尾美人蕉 (*C. iridiflora* Ruiz & Pav.) 和紫叶美人蕉 (*C. warszewiczii* A.); 以上述 4 个野生种的杂交种和柔瓣美人蕉为亲本,其后代组成了兰花美人蕉^[6]。本研究 RAPD 聚类结果也说明大花美人蕉和兰花美人蕉的亲缘关系较远,亲本起源存在明显的差别。另一方面,本研究聚类结果反映了供试的美人蕉品种与一些原始亲本的遗传关系:柔瓣美

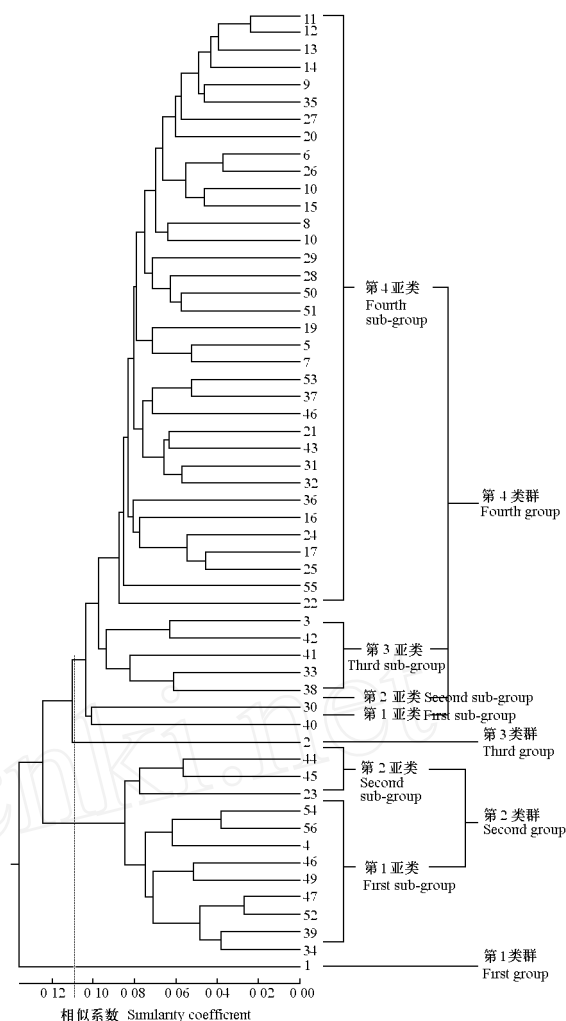


图 2 56 份美人蕉种质 RAPD 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of RAPD in *Canna* germplasm

人蕉处于兰花美人蕉类群中,与该类群各品种的遗传距离较小,说明兰花美人蕉类的品种均与柔瓣美人蕉具有较近的亲缘关系;粉美人蕉处于大花美人蕉类群中,与该类各品种亲缘关系较近,从而支持了粉美人蕉是大花美人蕉类主要原始亲本之一的观点。

聚类图表明,美人蕉、柔瓣美人蕉、粉美人蕉和蕉芋等 4 个野生种质与栽培品种的亲缘关系各不相同,反映了不同野生种在美人蕉杂交育种中的参与程度不同。根据美人蕉品种的起源和演变历史,美人蕉只在品种起源的初期(1848~1868)作为一个重要的育种亲本,到了后期(1893年后),由于美人蕉瓣化雄蕊细小,株型高,较少作为育种亲本。目前,品种的选育主要采用品种自交和品种间杂交的手段,很少以野生种作为直接的育种材料^[6,7]。比较美人蕉原生种与栽培品种的形态特征,可见二者在株型、瓣化雄蕊宽度,花色等方面均存在巨大差异^[10],反映了美人蕉与当前栽培品种的亲缘关系较远。本研究聚类图上,美人蕉在 0.11 处单独聚类,与大多数品种亲缘关系较远,从分子水平上进一步证实当前美人蕉品种较少有美人蕉的血缘。在美人蕉品种选育过程中,可以根据各原生种在育种上参与程度的不同,恰当增加新的种质,使之带来更大的变异,创造更多的特异品种。

参考文献:

- 1 Segeren W, Maas P J. The genus *Canna* in northern South America. *Acta Bot Neerl*, 1971, 20 (6): 663~680
- 2 吴征镒, 路安民, 汤彦承, 陈之端, 李德铎. 中国被子植物科属综论. 北京: 科学出版社, 2003. 301
Wu Z Y, Lu A M, Tang Y C, Chen Z D, Li D Z. The families and genera of angiosperms in China. Beijing: Science Press, 2003. 301 (in Chinese)
- 3 吴德邻. 中国植物志, 第 16 卷 (2). 北京: 科学出版社, 1981. 152~158
Wu D L. Flora of China, Volume 16 (2). Beijing: Science Press, 1981. 152~158 (in Chinese)
- 4 陈封怀. 广东植物志 (第二卷). 广州: 广东科技出版社, 1991. 433~436
Chen F H. Flora of Guangdong, Volume II. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1991. 433~436 (in Chinese)
- 5 Tanaka Novuyuki, Koyama Tetsuo. A new species of *Canna* (Cannaceae) from Northern Argentina. *Journal of Japanese Botany*, 2000 (75): 89~91
- 6 Cooke I. The gardener's guide to growing cannas. Portland: Timber Press Inc., 2001. 55~127
- 7 谭广文, 潘建明, 陈亦红. 杂种美人蕉品种分类研究初报. 广东园林, 1987, 2: 12~16
Tan G W, Pan J M, Chen Y H. Preliminary studies on taxonomy of hybrid cannas cultivars. Guangdong garden, 1987, 2: 12~16 (in Chinese)
- 8 Kumar P P, Yau J C K, Goh C J. Genetic analyses of *Heliconia* species and cultivars with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1998, 123 (1): 91~97
- 9 Pillay M, Ogundiwon E, Nwakanma D C. Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2001, 102: 965~970
- 10 Hayward Keith. *Canna handbook*. Farnborough: Hart Canna, 2000. 5~22
- 11 Du D L, Shu J, Zhou P, Zheng X Q, Huang B Z, Li F N. RAPD analysis of 33 varieties of banana. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43 (10): 1036~1042
- 12 邹喻苹, 蔡美琳, 王晓东, 徐本美. 古代“太子莲”及现代红花中国莲种质资源的 RAPD 分析. 植物学报, 1998, 40 (2): 163~168
Zou Y P, Cai M L, Wang X D, Xu B M. RAPD analysis of germplasm in ancient “Taizi Lotus” and modern Chinese Lotus. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40 (2): 163~168 (in Chinese)