

中国兰属植物种间及品种间亲缘关系的 RAPD 分析

孙彩云 张明永 叶秀霖* 梁承邺 夏快飞

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 利用 RAPD 分子标记分析中国兰属 (*Cymbidium*) 的 28 个原生种和部分种的不同品种及 3 个杂交种共 50 个材料间的亲缘关系。获得 250 条可明显区分的 DNA 扩增片段, 除 S143-850 bp 1 条带为全部材料共有外, 其余带均为多态性位点。这些带最大的为 2 100 bp, 最小的为 200 bp, 以集中在 1 031 ~ 300 bp 的带居多。UPGMA 进行聚类分析显示: RAPD 的聚类树状图所呈现出的亲缘关系大体与 ITS 系统发育树一致。建兰亚属可能为一自然类群。大花亚属并非自然类群, 其成员之一文山红柱兰 (*C. Wenshanense* Y. S. Wu et al.) 偏离出去而与兰亚属聚在一起。兰亚属则为一高度异质性的类群, 分散成互不关联的 3 支。本结果和 ITS 系统发育分析表明, 有必要对经典分类的兰属属下分类, 特别是兰亚属进行修订。对 3 个亚属中各组的划分基本与传统分类的一致。春兰品种间的多样性高于其它测试品种。

关键词: 兰属; 兰科; RAPD

中图分类号: S 682.31; Q 941+.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 06-1121-04

Studies on Relationship between Species, Cultivars of *Cymbidium* Using RAPD

Sun Caiyun, Zhang Mingyong, Ye Xiulin*, Liang Chengye, and Xia Kuaifei

(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: *Cymbidium* is a genus with very important values of horticulture. In the present study genetic closeness of various species of *Cymbidium* was determined using RAPD. A total of 250 amplified bands was gotten from all PCR reactions by 12 selected primers, and their band size was from 200 bp to 2 100 bp. Except of the 850 bp band amplified from S143 primer, all other amplified bands were diversity locus, and most of the bands were located between 1 030 bp and 300 bp. The UPGMA dendrogram showed some congruence with the previous ITS phylogeny, which revealed the paraphyly of subgen *Cyperorchis*, and high polyphyly of subgen *Cymbidium*. The subgroups within each subgenus revealed by the RAPD were, however, correspond to the traditional taxonomy based on gross morphology. This study also shows higher genetic diversity of *C. goeringii*, being cultivated for long history, than other *Cymbidium* species.

Key words: *Cymbidium*; Orchidaceae; RAPD

1 目的、材料与方法

日本学者曾应用 RAPD 技术对兰属 (*Cymbidium*) 36 个栽培品种的遗传多样性进行研究^[1]。国内梁红健等^[2]用 RAPD 对中国兰属 5 个种 19 个品种的亲缘关系进行探讨。张明永等^[3]用 PCR 扩增和直接测序的方法分析兰属的 27 个种、3 个栽培种和 3 个外来类群间的核 DNA ITS 序列。研究结果表明大花亚属和兰亚属都表现为一复系群, 建兰亚属为一并系群, 各亚属内组间的关系不明确。

本研究利用 RAPD 技术研究兰属的 50 个材料, 包括 28 个原生种, 3 个变种, 16 个品种, 3 个杂交种的遗传多样性和亲缘关系。材料详见表 1。

收稿日期: 2004 - 12 - 22; 修回日期: 2005 - 05 - 11

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2002A204, 2003A2010401)

* 通讯作者 Author for correspondence

表 1 试验所用种或品种

Table 1 The species, cultivars of *Cymbidium* for RAPD

编号 种或品种 Code Species or cultivars	来源 Source	编号 种或品种 Code Species or cultivars	来源 Source
1 纹瓣兰 <i>C. aloifolium</i> (L.) Sw	云南	26 墨兰 <i>C. sinense</i> (Jackson ex Andr.) Willd	广东
2 西山纹瓣兰 <i>C. aloifolium</i> (L.) Sw 'xishan wenbanlan'	云南	27 白墨 <i>C. sinense</i> (Jackson ex Andr.) Willd 'baimo'	广东
3 下关纹瓣兰 <i>C. aloifolium</i> (L.) Sw 'xiaguan wenbanlan'	云南	28 线艺墨兰 <i>C. sinense</i> (Jackson ex Andr.) Willd 'xianyimolan'	云南
4 硬叶兰 <i>C. bicolor</i> Lindl Subsp. <i>obtusum</i> Du Puyet Cribb	云南	29 海南墨兰 <i>C. sinense</i> (Jackson ex Andr.) Willd 'hainan molan'	海南
5 冬凤兰 <i>C. dayanum</i> Rchb f	云南	30 黑墨 <i>C. sinense</i> (Jackson ex Andr.) Willd 'heimo'	广东
6 多花兰 <i>C. floribundum</i> Lindl	云南	31 企黑 <i>C. sinense</i> (Jackson ex Andr.) Willd 'qihei'	广东
7 台兰 <i>C. floribundum</i> Lindl 'tailan'	云南	32 软剑白墨 <i>C. sinense</i> (Jackson ex Andr.) Willd 'nuanjian baimo'	华南植物园
8 果香兰 <i>C. suaveissimum</i> Sander ex C. Curtis	云南	33 落叶兰 <i>C. defoliatum</i> Y. S. Wu et S. C. Chen	云南
9 西藏虎头兰 <i>C. tracyanum</i> L. Castle	云南	34 莎叶兰 <i>C. cyperifolium</i> Wall ex Lindl	云南
10 虎头兰 <i>C. hookerianum</i> Rchb f	云南	35 寒兰 <i>C. kanran</i> Makio	广东
11 滇南虎头兰 <i>C. wilsonii</i> (Rolfe ex Cook) Rolfe	云南	36 青寒兰 <i>C. kanran</i> Makio 'qinghanlan'	广东
12 美花兰 <i>C. insigne</i> Rolfe	浙江	37 紫寒兰 <i>C. kanran</i> Makio 'zihanlan'	云南
13 朱砂蝉兰 <i>C. iridioides</i> D. Don	云南	38 蕙兰 <i>C. faberi</i> Rolfe	云南
14 长叶兰 <i>C. erythraeum</i> Lindl	云南	39 春兰 <i>C. goeringii</i> (Rchb f.) Rchb f	云南
15 碧玉兰 <i>C. lowianum</i> (Rchb f.) Rchb f	云南	40 朵香 <i>C. goeringii</i> (Rchb f.) Rchb f 'duoxiang'	云南
16 文山红柱兰 <i>C. wenshanense</i> Y. S. Wu et F. Y. Liu	云南	41 豆瓣兰 <i>C. goeringii</i> (Rchb f.) Rchb f 'doubanlan'	云南
17 莎草兰 <i>C. elegans</i> Lindl	云南	42 春剑 <i>C. goeringii</i> (Rchb f.) Rchb f var. <i>longibracteatum</i>	云南
18 大雪兰 <i>C. mastersii</i> Griff ex Lindl	云南	43 白花春剑 <i>C. goeringii</i> (Rchb f.) Rchb f 'baihua chunjian'	云南
19 马关兰 <i>C. mastersii</i> Griff ex Lindl 'maguanlan'	云南	44 广东朵香 <i>C. goeringii</i> (Rchb f.) Rchb f 'duoxiang'	广东
20 独占春 <i>C. eburneum</i> Lindl	云南	45 莲瓣兰 <i>C. Lianbanlan</i> Tang et Wang	云南
21 象牙白 <i>C. eburneum</i> Lindl 'xiangyabai'	海南	46 黄花莲瓣兰 <i>C. Lianbanlan</i> Tang et Wang 'huanghua lianbanlan'	云南
22 斑舌兰 <i>C. tigrinum</i> Parish ex Hook	云南	47 兔耳兰 <i>C. lancifolium</i> Hook	云南
23 韶关建兰 <i>C. ensifolium</i> (L.) Sw 'shaoguan jianlan'	广东	48 白墨 ×象牙白 <i>C. sinense</i> × <i>C. eburneum</i>	华南植物园
24 大青 <i>C. ensifolium</i> (L.) Sw 'daqing'	广东	49 西藏虎头兰 ×象牙白 <i>C. tracyanum</i> × <i>C. eburneum</i>	华南植物园
25 铁骨素 <i>C. ensifolium</i> (L.) Sw 'tiegusu'	云南	50 大花蕙兰 <i>C. ×hybridus</i>	华南植物园

总 DNA 的提取主要用常规 CTAB 法^[4], 叶片相对肉质的果香兰、斑舌兰、台兰、多花兰、纹瓣兰、硬叶兰用低盐 CTAB 沉淀法^[5]。除美花兰用干叶之外, 其它材料均为新鲜叶片。20 μL PCR 反应体系包括 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol·L⁻¹ KCl, 200 μmol·L⁻¹ 的各种 dNTPs, 0.3 μmol·L⁻¹ 的 primer, 20 ng 的模板 DNA; 1 units 的 Taq 聚合酶; 2.0 mmol·L⁻¹ 的 Mg²⁺; 25 μL 的矿物油。用于扩增的随机引物见表 2。PCR 反应在 PTC-100TM 上进行。反应程序: 94 4 min; 36 1 min; 72 2 min, 1 个循环。94 1 min; 36 1 min; 72 2 min, 28 个循环。94 1 min; 36 1 min; 72 10 min, 1 个循环。扩增产物用 1.5% Agarose 检测, 电泳结果用无镀膜黑白速照胶片照相记录。

以 100 bp Marker 作为分子量标记, 确定胶上各 RAPD 带的位置和分子量大小。在同一位置上的带属同一位点 (locus), 在某一个位点上, 有带的样品记为 "1", 无带记为 "0"。所得的位点按分子量从大到小排列。所获数据用 NTSYS-PC V1.80 软件处理, 计算 Jaccard 系数, 用 UPGMA 进行聚类分析, 得出树状图。

2 结果与讨论

2.1 RAPD 扩增结果

从 100 个购自上海 SanGon 的引物中初选出 20 个, 对 50 个材料进行 RAPD 扩增, 从中选出 12 个带多且亮, 重复性好的引物的扩增产物作为最后结果, 共获得 250 条可明显区分的 DNA 扩增片段,

表 2 用于 RAPD 的引物序列

Table 2 Sequence of the random nucleotide primers

引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence
S106	ACGCA TC GCA	S167	CAGCGACAAG
S121	ACGGA TC CTG	S174	TGACGGCGGT
S133	GGCTGCA GAA	S178	TGCCCA GCCT
S140	GGTCTAGAGG	S180	AAAGTGCGGG
S142	GGTGCGGGAA	S198	CTGGCGAACT
S143	CCAGATGCAC	S199	GAGTCAGCAG

除 S143 - 850 bp 1 条带为全部材料共有外, 其余带均为多态性位点。这些带最大的为 2 100 bp, 最小的为 200 bp, 以集中在 1 031 bp ~ 300 bp 之间的带居多 (图 1)。

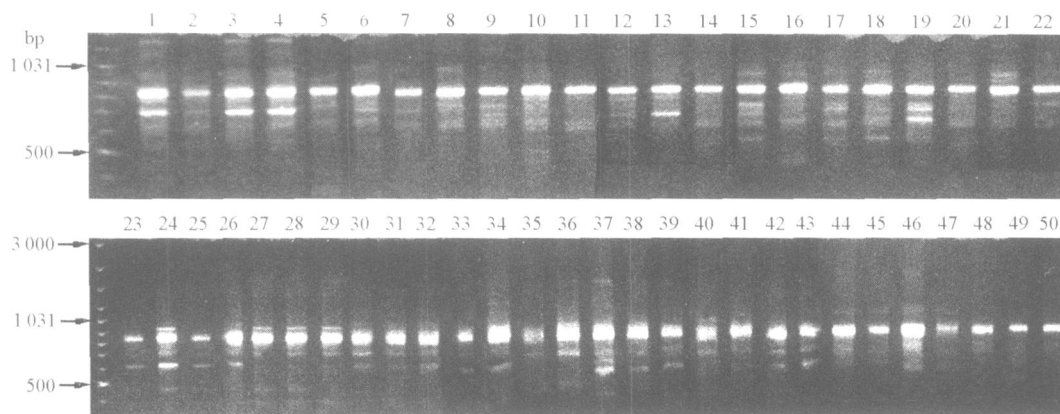


图 1 引物 S143 的 RAPD 扩增结果

1 ~ 50 为不同材料的编号, 详见表 1。

Fig 1 The RAPD amplified profile using the primer S143

1 - 50 are material codes, see table 1.

兰属 50 个材料的聚类树状图的 Jaccard 相似性系数主要集中在 0.100 ~ 0.250 之间, 其中建兰的两个品种: 韶关建兰和大青之间的相似系数最大, 为 0.644。白花春剑和碧玉兰、白墨、象牙白和冬凤兰、西藏虎头兰、象牙白和蕙兰、大花蕙兰和冬凤兰之间的相似系数最小的为 0.050。

2.2 亚属的划分

RAPD 的 UPGMA 聚类树状图 (图 2) 所呈现出亚属间的亲缘关系大体与 ITS^[3] 系统发育一致。建兰亚属可能为一自然类群 (虽然其成员之一广东朵香与建兰亚属的主体和大花亚属的主体构成三歧分支)。大花亚属并非自然类群, 其成员之一文山红柱兰偏离出去与兰亚属聚在一起。兰亚属则为一高度异质性的类群, 图 2 中兰亚属分散成互不关联的 3 支。本文的结果和 ITS 系统发育分析表明, 有必要对经典分类^[6] 兰属属下分类, 特别兰亚属进行修订。

2.3 组的划分和组间及种间亲缘关系

RAPD 的研究结果支持传统分类对兰亚属组的划分, 但文山红柱兰在硬叶组, 长叶兰在带叶组。

大花亚属中, 大花组和腋花组亲缘关系最近, 莎草组和斑舌兰组亲缘关系最近。在腋花组中, 独占春与大雪兰最先聚合, 然后是马关兰, 最后是象牙白, 这一结果不支持传统分类认为马关兰是大雪兰的变种, 象牙白是独占春变种的观点。

《中国植物志》第十八卷^[7] 把建兰亚属分为 3 个组, 其中把春兰组合到建兰组。而有文献把春兰组和建兰组分开^[6]。从树状图看, 建兰亚属的 3 个组中, 建兰组和春兰先聚合成 1 个大分支, 兔耳兰

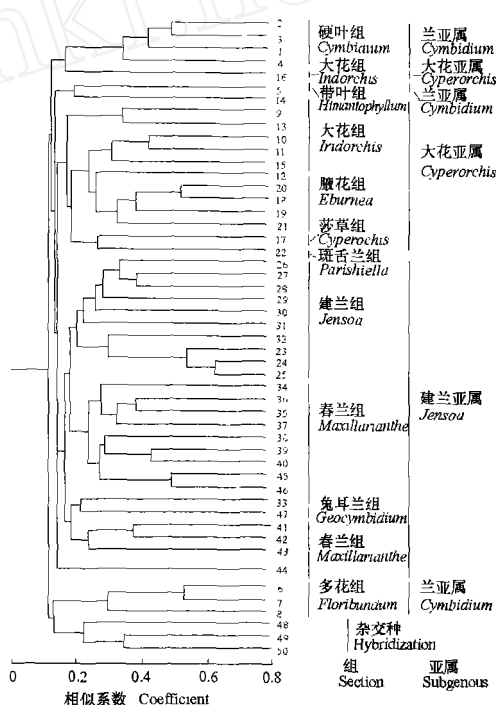


图 2 兰属种间、品种间 RAPD 的 UPGMA 聚类树状图

Fig 2 UPGMA dendrogram of 50 *Cymbidium* species, cultivars in China based on Jaccard coefficient obtained from 12 RAPD primers

组与落叶兰和一些野生花组成另一分支。所以, 建兰组和春兰组无论分开或合并都可以。本研究与 Puy等^[6]、梁红健等^[2]对寒兰的分类的看法不同, 而支持陈心启^[8]的观点, 把寒兰与莎叶兰、春兰、蕙兰、莲瓣兰放在一起构成春兰组。建兰组中, 传统分类把落叶兰归在建兰组中, 本研究却显示它与兔耳兰亲缘关系较近。建兰和墨兰的各个品种都先聚合, 然后再构成建兰组, 说明两者亲缘关系很近。

2.4 种间多样性

RAPD结果显示种内不同品种间的多样性不同, 仅春兰各品种间的变异较高, 这造成品种间形成了两个分枝, 而纹瓣兰、大雪兰、墨兰、韶关建兰、寒兰、台兰等种内各品种都聚在一起形成 1 个单独的分枝, 这些种内不同品种间的遗传多样性不高。

参考文献:

- 1 Obara-Okey P, Kako S Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers Euphytica, 1998, 99: 95 ~ 101
- 2 梁红健, 刘 敏, 钟志宇, 吴应祥, 李文彬. 中国部分兰花品种 RAPD分析. 园艺学报, 1996, 23 (4): 365 ~ 370
Liang H J, Liu M, Zhong Z Y, Wu Y X, Li W B. Identification and classification *Cymbidium* of Chinese *Cymbidium* with RAPD. Acta Horticulturae Sinica, 1996, 23 (4): 365 ~ 370
- 3 Zhang M Y, Sun C Y, Hao G A preliminary analysis of phylogenetic relationships in *Cymbidium* (Orchidaceae) based on nrITS sequence data Acta Botanica Sinica, 2002, 44 (5): 588 ~ 592
- 4 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 131 ~ 137
Fu R Z, Sun Y R, Jia S R. Manual of genetic transformation in plant Beijing: Science and Technic Press of China, 1994. 131 ~ 137 (in Chinese)
- 5 Simon A, Wamer J. Genomic DNA isolation and lambda library construction, plant gene isolation: principles and practice. John Wiley & Sons Ltd, 1996. 51 ~ 75
- 6 Du Puy D, Cribb P J. The genus *Cymbidium*. Poregon: Timber Press, 1988. 1 ~ 236
- 7 陈心启. 中国植物志 (第十八卷). 北京: 科学出版社, 1999. 18, 197 ~ 227
Chen S C. Fl Reipubl Popularis Sin (Vol 18). Beijing: Science Press, 1999. 18, 197 ~ 227 (in Chinese)
- 8 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书. 北京: 中国林业出版社, 1998. 70 ~ 102
Chen S C, Ji Z H. The orchids of China Beijing: China Forestry Publishing House, 1998. 70 ~ 102 (in Chinese)

中国园艺学会第七届青年学术讨论会

中国园艺学会第九届第 8 次常务理事扩大会议决定, “中国园艺学会第七届青年学术讨论会”由山东农业大学园艺科学与工程学院和山东省园艺学会承办, 将于 2006 年 7 月或 8 月在山东泰安举行。

会议交流主题: (1) 园艺作物种质资源、遗传育种与生物技术; (2) 园艺作物有机、无公害及标准化安全生产; (3) 园艺作物栽培及生理、生态; (4) 园艺作物采后处理、贮藏与加工技术; (5) 园艺作物病虫害综合治理; (6) 园艺环境与工程; (7) 设施园艺; (8) 园艺作物种业; (9) 园艺教育; (10) 园艺产品的国内与国际贸易; (11) 其他。会议征文需提交未公开发表过的论文。其撰写格式请参照《园艺学报》论文的格式要求, 字数 (含图表) 勿超过 5 000 字。论文可通过电子邮件 (xkzhao@sdau.edu.cn; yykx2238@163.com) 提交, 也可邮寄拷贝有该论文的 3.5 寸软盘 (Microsoft Word 格式)。经专家评审被接受的论文将在会议召开之前编辑成论文集, 正式出版发行。征文截止日期: 2005 年 12 月 31 日。

联系人: 赵祥奎、王秀峰; 联系地址: (271018) 山东泰安岱宗大街 61 号, 山东农业大学园艺科学与工程学院“学术会议秘书组”; 电话: 0538 - 8242654, 8242456; 传真: 0538 - 8242654, 8242456; 电子信箱同上。

山东农业大学
园艺科学与工程学院