

不同来源红 木材料的 RAPD 分析及分类学探讨

李晨东^{1*} 唐前瑞² 陈德富^{1* *} 夏立新¹ 陈喜文¹ 陈友云²

(¹南开大学生物化学与分子生物学系, 天津 300071; ²湖南农业大学园艺系, 长沙 410128)

摘要: 以 2 个生态型 木材料为对照, 对在各原产地收集到的 14 个红 木材料进行 55 个随机引物的 RAPD 反应, 共产生 632 条稳定的扩增带, 其中 427 条具有多态性。按扩增带的有无列出二元数据矩阵, 利用 NTSYS pc 计算 Nei 氏相似系数及遗传距离, 利用 SAS 软件进行主成分分析。结果表明: 红 木是 木的变种, 供试的 14 个红 木材料分属 4 类, 其突变途径可能是一个复杂的过程, 存在着 木不同生态型间、 木与红 木之间, 红 木之间的相互作用。

关键词: 红 木; RAPD; 遗传距离; 聚类分析

中图分类号: S 68 文献标识码: A 文章编号: 0513 353X (2002) 04-0358-05

RAPD 技术是研究系统进化、分类学等问题的有效工具^[1~ 4], 国内外已成功地应用 RAPD 技术对多种植物进行了亲缘关系、系统进化和品种鉴定等研究。红 木 (*Loropetalum chinense* var. *rubrum*) 是常绿或半落叶灌木, 属金缕梅科 (*Hamamelidaceae*) 金缕梅亚科 (*Sulfam* H.) 木属 (*Loropetalum*), 其野生种产于湘东山区, 即罗霄山脉腹部的浏阳与醴陵相邻区域^[5]。由于其叶型小巧、叶色与众不同, 具有极大的观赏价值和经济价值。目前因自然变异, 已发现许多突变类型。现在对红 木的研究大多局限于生理、组织培养等方面, 其分类的研究也仅在生理水平得出红 木是 木 (*Loropetalum chinense*) 的变种的结论^[10]。作者以来源于两个不同生态型的 木为对照, 采用 RAPD 技术对 14 个红 木材料的遗传关系进行了研究, 探讨了红 木的突变途径和可能的起源, 旨在为红 木资源的整理、品种命名等提供相关的分子生理学基础, 也为红 木的遗传育种、遗传工程等提供一些有益的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料取自湖南农业大学园艺系园林植物资源圃 3 年生扦插苗, 根据来源和形态特征收集了 14 个红 木材料, 几乎包括了各产地所能收集的红 木材料。以来源不同的两个生态型 木为对照 (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 红 木总 DNA 的提取 在湖南初春季节 (3 月 1~ 7 日) 收集叶片, 随机摘取 2 g 幼嫩叶片, 立即带回实验室按文献 [6] 方法提取总 DNA。

1.2.2 RAPD 及其产物的检测 为了保证结果的可重复性, 每个 RAPD 扩增重复 2 次以上。扩增反应体系为 22 μ L/管, 其中包括 1 \times 缓冲液, $MgCl_2$ 2.5×10^{-6} mol/L, dNTP 0.4×10^{-6} mol/L, 引物 2×10^{-7} mol/L, 2 U Taq DNA 聚合酶 (上海 Sangon 产品) 及 100 ng 模板 DNA。扩增反应在 PTC-200 型热循环仪 (MJ Research Inc.) 上进行, 研究所用的随机引物及序列见表 2。反应首先 94 $^{\circ}C$ 变性 5 min, 然后进行

收稿日期: 2001-06-15; 修回日期: 2001-11-13

基金项目: 国家教育部高等学校骨干教师资助计划项目 [教技司 (00) 65 号]

* 现工作单位: 天士力集团生物技术和生物制品研究开发中心。

* * 通讯联系人, E-mail: chendefu@public.tpt.tj.cn.

以下 41 个循环: 94℃ 40 s, 37℃ 32 s, 72℃ 105 s, 最后于 72℃延伸 7 min。取 8 μL 扩增产物在 1.6% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳介质为 1×TAE 缓冲液, 电泳完毕以 0.5 μg/mL 浓度的 EB 染色 30 min, 用蒸馏水振荡洗涤凝胶 15~ 30 min, 紫外透射仪上观察照相。

表 1 不同来源的红 木材料

Table 1 The list of materials of *L. chinense* var. *rubrum* from different fountainhead areas

编号 No.	来 源 地 Fountainhead area	叶 色 Leaf color	叶 形 Leaf shape
1	湖南浏阳柏加乡 Bojia country Liuyang, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
2	湖南浏阳团然乡 Tuanran country, Liuyang, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
3	湖南浏阳柏加乡 Bojia country, Liuyang, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
4	湖南浏阳柏加乡 Bojia country, Liuyang, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
5	湖南浏阳团然乡 Tuanran country, Liuyang, Hunan	紫 Purple	菱 形 Lozenge
6	湖南浏阳永和镇 Yonghe town, Liuyang, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
7	湖南浏阳永和镇 Yonghe town, Liuyang, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
8	湖南浏阳柏加乡 Bojia country, Liuyang, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
9	湖南长沙天心区 Tianxin district, Changsha, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
10	湖南长沙芙蓉区 Furong district, Changsha, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
11	湖南长沙苗圃 Nursery garden of Changsha, Hunan	紫 红 Purple red	椭 圆 Ellipse
12	湖南浏阳郊区 Suburbs of Liuyang, Hunan	紫 红 Purple red	卵 圆 Egg round
13	湖南长沙望城县 Wangcheng country, Changsha, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
14	湖南长沙天心区 Tianxin district, Changsha, Hunan	红 赭 Red ochre	椭 圆 Ellipse
15 (CK)	湖南桑植 Sangzhi, Hunan	绿 Green	椭 圆 Ellipse
16 (CK)	湖南浏阳永和镇 Yonghe town, Liuyang, Hunan	绿 Green	椭 圆 Ellipse

1.2.3 数据处理 每个材料扩增带的有无分别以 1、0 代表。利用 NTSYS-pc 软件的 Nei 和 Li^{〔7〕}的方法计算各材料间的简单相似系数 F, 并转换成遗传距离 (D= 1- F)。F= 2× S_{ab}/ (S_a+ S_b), 其中 S_a、S_b 代表两材料的总扩增带数, S_{ab}为两材料共有的扩增带数。然后按 NTSYS-pc 中的非加权算术平均数方法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UWPGA) 对 Nei 相似系数进行聚类, 并利用 SAS 软件进行主成分分析 (principal components analysis, PCA)。

2 结果与分析

2.1 DNA 多态性分析

采用上海 Sangon 公司合成的 116 个 10 mer 随机引物进行 RAPD 分析, 均能产生扩增带, 有 84 个随机引物的扩增带有差异, 其中 55 个随机引物的扩增带清晰而稳定, 大小为 200~ 3000 bp (图 1), 平均每个引物的扩增带数为 11.49 条, 55 个引物产生稳定的多态性扩增产物见表 2。从以上结果可以

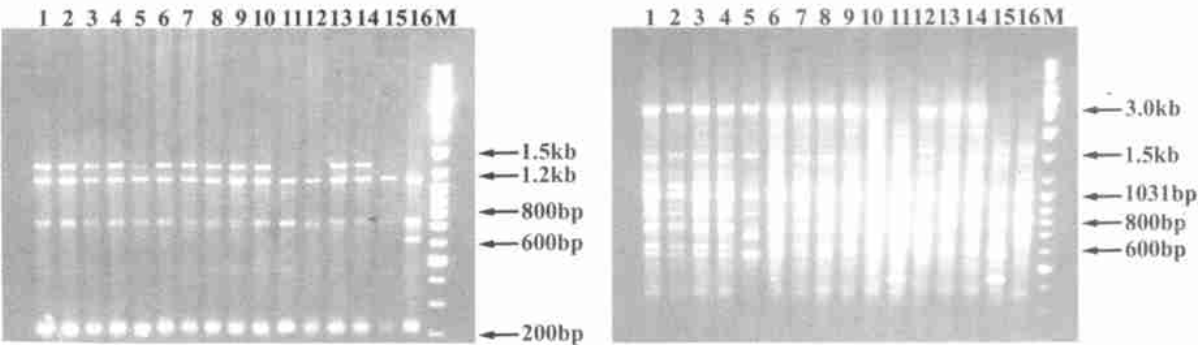


图 1 引物 S2 (左) 和 S35 (右) 的 RAPD 扩增结果
1~ 16 为不同材料的编号, 详见表 1, M 为 GeneRuler™ DNA Ladder Mix。
Fig. 1 The RAPD amplified profile using the primer S2 (Left) and S35 (right)

看出, 55 个随机引物共产生 632 个扩增产物, 其中 427 个具有多态性, 占 67. 6%。产生多态性结果的随机引物的所有扩增产物都用于分析, 由于 RAPD 是显性标记, 所以每个扩增产物都可以看作是一个性状, 相当于比较了 16 份供试材料的 632 个性状, 其中 427 个性状是多态的。

表 2 产生 RAPD 多态性带的随机引物
Table 2 The list of the used primers which amplified polymorphic bands by RAPD

引物 Primers	序 列 Sequences	总带数 Total bands	多态性带 Polymorphic bands	%	引物 Primers	序 列 Sequences	总带数 Total bands	多态性带 Polymorphic bands	%
S1	GTTCGCTCC	8	5	62.5	S161	ACCTGGACAC	12	9	75.0
S2	TGATCCCTGG	8	4	50.0	S162	GGAGGAGAGG	8	6	75.0
S4	GGACTGGAGT	16	13	81.3	S165	TGTTCCACGG	6	5	83.3
S6	TGCTCTGCC	8	5	62.5	S166	AAGGCGGAG	10	2	20.0
S7	GGTGACGCAG	15	13	86.7	S182	CCTCTGACTG	15	12	80.0
S8	GTCCACACGG	18	17	94.4	S183	CAGAGGTC	9	4	44.4
S10	CTGCTGGGAG	12	5	41.7	S186	GATACCTCGG	6	4	66.7
S21	CAGGCCCTTC	8	4	50.0	S187	TCCGATGCTG	6	2	33.3
S23	AGTCAGCCAC	5	1	20.0	S188	TTCAGGTGG	6	5	83.3
S24	AATCGGGCTG	12	4	33.3	S189	TCTGTGTC	7	4	57.1
S25	AGGGGTCTTG	18	8	44.4	S190	ACGGTTCAG	6	3	50.0
S26	GGTCCCTGAC	13	9	69.2	S202	GGAGAGACTC	10	6	60.0
S27	GAAACGGGTG	15	10	66.7	S203	TCCACTCTG	6	3	50.0
S29	GGTAACGCC	18	15	83.3	S208	AACGGCGACA	13	9	69.2
S30	GTGATCGCAG	10	5	50.0	S209	CACCCCTGAG	17	10	58.8
S31	CAATAGAACT	15	12	80.0	S431	TGCGCGAAA	12	11	91.7
S32	TCGGCGATAG	18	14	77.8	S432	CACAGACACC	9	6	66.7
S33	CAGCACCCAC	11	4	36.4	S433	AGCGTCACTC	10	7	70.0
S34	TCTGTGCTGG	14	11	78.6	S434	TGCTGCGGGT	11	9	81.8
S35	TTCCGAACCC	21	16	76.2	S436	AAGCGACCTG	16	8	50.0
S36	AGCCAGCGAA	15	13	86.7	S437	CATTGGGGAG	12	11	91.7
S38	AGGTGACCGT	15	10	66.7	S439	CTCCGTACTG	13	10	76.9
S98	GGCTCATGTG	7	3	42.9	S440	GGTGCTCCGT	8	5	62.5
S99	GTGAGGGCAA	7	4	57.1	S1291	GA C C C G A C A	14	12	85.7
S103	AGAGCTCCAC	17	9	52.9	S1295	GGCAGCAGGT	5	4	80.0
S111	CTTCCGCACT	19	15	78.9	S1299	CTCGATCACC	5	4	80.0
S147	AGATGCAGCC	13	4	30.8	S1475	TGCTGGACC	8	7	87.5
S159	ACGGCGTAGT	16	15	93.8	Total		632	427	67.6

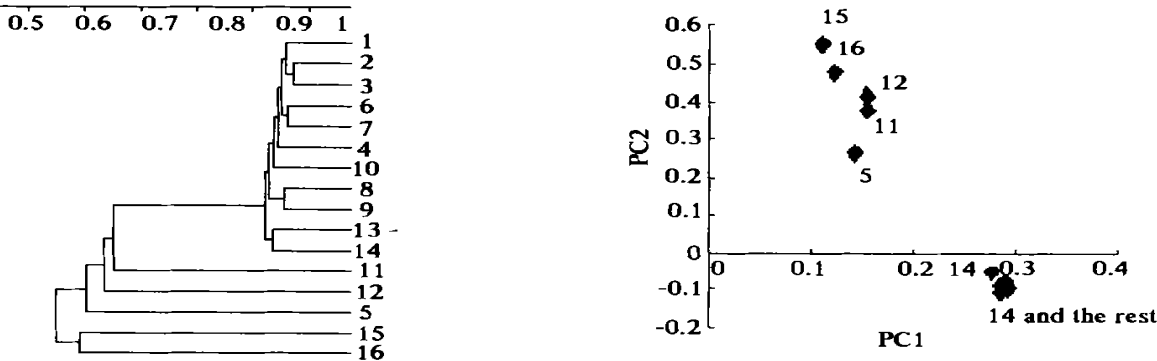


图 2 根据 RAPD 资料计算的不同材料间亲缘关系聚类图(左)与 PCA 分析图(右)
1~ 16 如表 1。

Fig.2 Genetic relationship dendrogram of different materials generated from RAPD data(left), figure based on PCA(right)

1- 16 and M indicates as in table 1.

2.2 供试材料间的遗传关系

聚类分析结果 (图 2) 显示作为对照的红 木聚在一起, 供试的 14 个红 木材料聚在一起, 说明它们分属不同类型; 在红 木中通过聚类图又可以细分出四类: 5 号为第一类, 12 号为第二类, 11 号为第三类, 其他红 木材料 1~ 4、6~ 10、13 和 14 号为第四类。PCA 结果同样很好地显示了它们之间的亲缘关系, 将 木和红 木以及红 木各类间区分开来。根据它们间的遗传距离 (表 3), 我们发现第四类红 木与湖南浏阳 木的亲缘关系较近, 而第一、三类红 木与湖南桑植 木的亲缘关系较近, 第二类红 木与两个不同生态型 木的遗传距离相同。并且 RAPD 分析得到的结果与各材料间叶片的形态差异非常吻合, 第一类红 木为紫色菱形叶片, 第二类为紫红色卵圆形叶片, 第三类为紫红色椭圆形叶片, 第四类为红赭色椭圆形叶片。

表 3 根据 RAPD 资料计算的不同材料的遗传距离

Table 3 The genetic distance matrix of different materials based on RAPD data																
编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0															
2	0.0482	0														
3	0.0373	0.0285	0													
4	0.0548	0.0504	0.0482	0												
5	0.3969	0.3794	0.3772	0.3991	0											
6	0.0592	0.0548	0.0395	0.0614	0.3772	0										
7	0.0504	0.0504	0.0351	0.0658	0.3860	0.0395	0									
8	0.0724	0.0768	0.0702	0.0877	0.4035	0.0614	0.0658	0								
9	0.0746	0.0658	0.0592	0.0855	0.3969	0.0636	0.0724	0.0461	0							
10	0.0746	0.0614	0.0548	0.0680	0.3925	0.0636	0.0680	0.0855	0.0658	0						
11	0.3377	0.3465	0.3311	0.3531	0.4452	0.3399	0.3355	0.3531	0.3553	0.3553	0					
12	0.3706	0.3531	0.3596	0.3596	0.4123	0.3596	0.3596	0.3640	0.3662	0.3706	0.3706	0				
13	0.0724	0.0680	0.0614	0.0746	0.4035	0.0658	0.0746	0.0746	0.0636	0.0680	0.3575	0.3684	0			
14	0.1009	0.0921	0.0855	0.1031	0.3969	0.0855	0.0899	0.0943	0.0877	0.0921	0.3640	0.3882	0.0680	0		
15	0.4518	0.4693	0.4539	0.4671	0.4846	0.4539	0.4539	0.4583	0.4693	0.4737	0.4430	0.4539	0.4671	0.4649	0	
16	0.4211	0.4386	0.4320	0.4364	0.4934	0.4232	0.4189	0.4364	0.4474	0.4518	0.4518	0.4539	0.4452	0.4386	0.4123	0

注: 编号见表 1。 Note: No. see table 1.

3 讨论

3.1 供试红 木材料的分类

本研究结果显示红 木不同材料间的遗传距离在 0.029~ 0.399 间, 而与 木的遗传距离都在 0.42 以上, 大多在 0.45 左右。如果我们将供试材料分成两大类 (比如在遗传距离 0.40 处划分), 则可将 木与红 木明显分开, 结合生理上的结论^[5], 我们认为红 木为 木的一个变种。若对 14 个不同来源的红 木材料再细分成 4 个类型, 则可将 5 号划为第一类, 12 号划为第二类, 11 号划为第三类, 其它红 木材料划为第四类。其中第四类的 11 个材料间的遗传距离在 0.03~ 0.10 之间, 说明彼此间的亲缘关系十分密切, 这些红 木材料很可能来源于同一个株系, 相互之间仅存在着微小的个体差异。

对供试材料的形态特征与分子聚类结果对比分析, 发现聚类结果与各材料叶片间的形态特征基本吻合。14 个红 木材料的叶色为红色, 木叶片为绿色, 从形态和分子水平都可以明显地将红 木和 木分成两大类。在红 木 4 类中, 第一类叶色为紫色, 第二、三类为紫红色, 第四类为红赭色。并且第一类叶形为菱形, 其它类型都为扁圆形。第二类与第三类是各类之间遗传距离最近的 (根据表 3 计算得到), 从二者的形态上也能够得到相似的结论, 但它们之间也有一定差异, 第二类的叶形是卵圆形, 第三类的叶形与大部分红 木相似, 为椭圆形。结合这些形态特征和我们得到的聚类结果,

进一步说明了 RAPD 标记技术是寻找种类差异和多态性研究的有效手段。上述 RAPD 分析结果可为合理开发红木资源提供依据。

3.2 红 木突变途径的探讨

红 木是 木的变种。第一类红 木 (5 号) 与 木的平均遗传距离是 0.4890, 第二类红 木 (12 号) 是 0.4539, 第三类 (11 号) 是 0.4474, 第四类 (其它) 是 0.4488。因此推测 木可能首先突变到第三类红 木, 经过第四、第二类, 最后突变到第一类。

从遗传距离 (表 3) 中不难发现, 第四类红 木与两个不同生态型 木的遗传距离也不尽相同, 第四类红 木与 15 号 木的遗传距离大于与 16 号 木的遗传距离, 所以可以初步认为第四类红 木更可能是由湖南浏阳 木突变而来。但对第一类、第三类红 木与不同生态型 木的遗传距离分析情况则完全相反, 这两类的红 木材料都是与 16 号 木的遗传距离大于与 15 号 木的遗传距离, 说明这二类的红 木更可能是由湖南桑植 木突变而来。再对第二类红 木与 15、16 号 木的遗传距离进行分析, 发现遗传距离相同。由于我们不了解浏阳 木与桑植 木之间的突变过程, 所以也就无法对红 木原产地的问题进行探讨, 但本文结果可以初步说明红 木的突变过程不是仅由一个生态型 木单独突变而成的, 有可能是由多个生态型 木共同突变而成的。也就是说红 木的突变是一个非常复杂的过程, 其中存在着不同生态型 木间的作用, 红 木与 木间的作用, 还有红 木之间的相互作用。

参考文献:

- 1 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K L, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (22): 6531~ 6535
- 2 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. *植物学报*, 1996, 38 (12): 952~ 962
- 3 Gonzalez J M, Ferrer E. Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. *Genome*, 1993, 36: 1029~ 1031
- 4 Maillia E F, Soles G J. The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. *Genome*, 1996, 39: 646~ 654
- 5 黄瑞康, 杨金桂, 贺中华, 等. 红 木资源调查研究. *湖南农业科学*, 1998, 4: 44~ 45
- 6 陈德富, 陈喜文, 侯志波, 等. 黄瓜随机扩增多态 DNA (RAPD) 研究初报. *南开大学学报 (自然科学)*, 1999, 32 (4): 47~ 50
- 7 Nei M, Li W A. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76: 5269~ 5273

RAPD Analysis and Taxology Discussion on *Loropetalum chinense* var. *rubrum* Materials from Different Fountainhead Areas

Li Chendong¹, Tang Qianrui², Chen Defu¹, Xia Lixin¹, Chen Xiwen¹, and Chen Youyun²

(¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China; ²Department of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Contrasted with 2 different *Loropetalum chinense* ecotypes, fourteen *Loropetalum chinense* var. *rubrum* materials representing almost all the types could be were analyzed by RAPD in this paper. Fifty-five random primers produced 632 steady amplified bands in total, among them 427 bands were polymorphic. Strong and clear bands were scored for their presence or absence in a binary data matrix. Nei's similarity coefficients and genetic distances were calculated by NTSYS-pc software, and principal components analysis was done by SAS software. The result demonstrated that *L. chinense* var. *rubrum* is a mutant of *L. chinense* on molecular level and 14 *L. chinense* var. *rubrum* materials were classified into 4 groups. The mutant pathway of 4 groups is possibly a complicated process, including interactions between different ecotypes *L. chinense*, interactions between *L. chinense* and *L. chinense* var. *rubrum*, and ineractions between different *L. chinense* var. *rubrum*.

Key words: *Loropetalum chinense* var. *rubrum*; RAPD; Genetic distances; Cluster analysis