

刚竹属 (*Phyllostachys*) 23个观赏竹种间亲缘关系的 RAPD 分析

高素萍¹ 任艳军^{1,2} 陈其兵¹

(¹四川农业大学林学院园艺学院, 四川雅安 625014; ²四川西南勘察设计院, 四川成都 610066)

摘要: 本文采用 RAPD 技术分析了刚竹属 23 个种或变种的 DNA 多态性。从 37 个随机引物中选出多态性效果好的 6 个引物, 共获得 47 个 DNA 扩增片段, 大小处于 0.3~1.05 kb, 扩增表现出明显的多态性, 高达 93.6%。对 RAPD 产物进行相似系数统计和聚类分析, 结果同形态分类结果基本吻合, 但其中个别竹种出现了不同结果, 即: 与种和其变种是聚在一类的结论不一致, 因此, 对个别竹种有待进一步研究。

关键词: 刚竹属; 引物; DNA 多态性; 遗传距离; 亲缘关系

中图分类号: S 68 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0566-05

RAPD Analysis of Genetic Relationships among the 23 Ornamental Bamboo Species in *Phyllostachys*

Gao Suping¹, Ren Yanjun^{1,2}, and Chen Qibing¹

(¹College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; ²Academy of Southwest Exploration and Design, Chengdu, Sichuan 610066, China)

Abstract: 23 species of *Phyllostachys* were analyzed by amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Six primers out of 27 random primers showed high polymorphism. Totally 47 of the polymorphic amplification DNA fragments were obtained. The length ranged from 0.3 kb to 1.05 kb. The polymorphic amplification has showed distinct polymorphism, about 93.9%. The results of cluster analysis and similarity coefficient statistics from RAPD analysis were identical in the main with that from morphological taxonomy, although a few species not in good agreement with the morphological properties. This species need to be studied further.

Key words: *Phyllostachys*; Primer; Amplified polymorphic DNAs; Genetic distance; Genetic Relationships

刚竹属 (*Phyllostachys*) 植物在我国有 50 余种, 在竹亚科中系种类最多的属。除新疆、内蒙、东北、青海等地外, 全国各地均有自然分布或栽培。该属是竹类植物中较耐寒的类群, 成为我国北方地区发展竹类生产和园林绿化的主要栽培对象, 并成为“南竹北移”的首选种类。

竹类植物在有花植物中具有特殊的生长发育规律, 形态特殊多变, 且大多不开花或不常开花, 这决定了竹类植物难以用传统的花、果等形态为主的分类方法加以区分。目前大多数学者用竹营养体来分类, 但还无法做到仅靠营养体外部形态特征来鉴别竹属, 更无法确定 1 个属或 1 个种在整个系统中的地位^[1]。本研究对刚竹属中观赏价值较高的 23 个竹种进行种间亲缘关系的分子研究, 在传统形态分类基础上, 从分子水平确定种间的亲缘关系。其结果不仅对一些传统分类方法和结果有一定的补充和完善, 而且为今后培育新品种, 丰富园林植物材料有一定现实意义。

1 材料与方法

1.1 试材

试材为刚竹属观赏价值高、园林绿化中广泛运用的 23 个竹种, 详见表 1。选取竹子嫩叶, 每种

收稿日期: 2005-07-05; 修回日期: 2005-12-30

基金项目: 四川省教育厅资助项目 (2004A030)

取样 3~5株, 野外采集用冰壶和变色硅胶快速干燥, 带回实验室后置于 -70℃ 下低温保存, 每个种的样品混和后用于提取 DNA。

表 1 供试竹种一览表

Table 1 The bamboo species tested in the experiment

编号 Code	种名 Chinese name of species	拉丁学名 Latin name of species	编号 Code	种名 Chinese name of species	拉丁学名 Latin name of species
1	人面竹	<i>Phyllostachys aurea</i> Carr. ex A. et C. Riviere	13	黎子竹	<i>P. heteroclada</i> f. <i>purpurata</i> (McClure) Wen
2	紫竹	<i>P. nigr</i> (Lodd.) Munro var. <i>nigra</i>	14	云和乌哺鸡竹	<i>P. yunhoensis</i> S. Y. Chen et C. Y. Yao
3	筠竹	<i>P. glauca</i> f. <i>uouzu</i> J. L. Lu	15	黄槽竹	<i>P. aureosulcata</i> McClure
4	绿皮黄筋竹	<i>P. Sulghurea</i> cv. Houzeau	16	黄槽毛竹	<i>P. heterocycla</i> cv. <i>Luteosulcata</i>
5	黄槽石绿竹	<i>P. arcana</i> f. <i>luteosulcata</i> C. D. Chu et C. S. Cha	17	花毛竹	<i>P. heterocycla</i> cv. <i>Tao Kiang</i>
6	毛金竹	<i>P. nigr</i> var. <i>henonnis</i> (Mitford) Stapf ex Rendle	18	龟甲竹	<i>P. heterocycla</i> (Carr.) Mitford
7	金镶玉竹	<i>P. aureosulcata</i> f. <i>spectabilis</i> C. D. Chu et C. S. Chou	19	黄条早竹	<i>P. praecox</i> f. <i>notata</i> S. Y. Chen et C. Y. Yao
8	黄皮竹筋竹	<i>P. sulphurea</i> cv. Robert young	20	黄秆乌哺鸡竹	<i>P. vivax</i> f. <i>aureocaulis</i> N. X. Ma
9	京竹	<i>P. aureosulcata</i> f. <i>pekinensis</i>	21	黄纹竹	<i>P. vivax</i> f. <i>huamwenahu</i> J. L. Lu
10	斑竹	<i>P. bambusoides</i> f. <i>lacrimata</i> kengf. et We	22	早竹	<i>P. praecox</i> C. D. Chu et C. S. Chao
11	黄秆京竹	<i>P. aureosulcata</i> f. <i>aureocaulis</i> Z. P. Wang et N. X. Ma	23	乌哺鸡竹	<i>P. vivax</i> McClure
12	强竹	<i>P. heterocycla</i> cv. <i>Obliquinoda</i>			

注: 采集地均为四川宜宾长宁县“世纪竹园”。

Note: The samples were collected in the bamboo garden, Changning county, Sichuan

1.2 基因组 DNA 的提取

DNA 的提取与纯化采用改进的 CTAB 法^[2-7]。取 10~50 g 新鲜叶片, 在无菌水下洗涤, 吸干后放入液氮中冻结。用研钵将叶片研成粉状, 迅速倒入 5 mL 的试管中, 量为试管的 1/3~1/2 即可。将 2 mL 预热的 1×CTAB 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.7 mmol/L NaCl EDTA, 1% CATB, 20 mmol/L 2-巯基乙醇) 加入磨碎的叶片中, 轻轻摇匀, 65℃ 水浴 40 min, 其间不时摇匀。用等体积的 24:1 的三氯甲烷/异戊醇抽提匀浆液, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液后, 再加入等体积的 24:1 的三氯甲烷/异戊醇抽提匀浆液, 摇荡 10 min, 离心 5 min, 取上清液, 重复该步骤, 直至两液间不再有乳白色物质存在。加入 1/100 体积 RNA 酶贮液, 颠倒摇匀, 37℃ 保温 30 min。快速加入等体积异丙醇 (4:1) 沉淀 DNA。将 DNA 用 70% 乙醇洗 2 次, 再用无水乙醇洗 1~2 次。将 DNA 晾干, 加无菌水溶解, 置 -20℃ 贮存备用。

用核酸蛋白质仪检测 DNA 浓度, 0.8% 的琼脂糖胶电泳检查 DNA 的完整性, 并稀释至 100 mg/μL 备用。

1.3 RAPD 反应体系建立

此过程包括 RAPD 扩增反应体系与反应程序的交叉试验。

优化体系时选择购自北京赛百盛公司的引物 A01 (碱基序列 GAGGCCCTTC), A15 (碱基序列 TTCCGAACCC) 和 A20 (碱基序列 GTTGCGATCC), DNA 模板选择样 1、样 2 和样 3。

体系优化交叉试验设 DNA 模板用量和引物两个因素, 分别取 4 个 (20, 30, 40, 50 ng) 和 2 个 (50, 100 pmol/μL) 水平进行交叉试验, 同时结合进行 3 个 RAPD 扩增反应条件的筛选。

通过筛选, 本研究扩增反应体系为: 引物 (5 pmol/μL) 1.0 μL; 模板 DNA (100 ng/μL) 0.5 μL; 10×buffer 2 μL; Mg²⁺ (20 mmol/L) 1.0 μL; Taq 聚合酶 1 U; 1.6 μL dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 100 pmol/μL), 无菌水定容到 20 μL。程序按: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 反应进行 45 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 结束扩增。

1.4 PCR 扩增

取 12 μL 反应产物, 加入 1 g/mL 的溴化乙锭 0.5 μL 于 0.8% 琼脂糖凝胶中, 电极缓冲液为 0.5×

TBE, 在 4 V/cm 的电场强度下电泳 2 h 左右, EB 染色, 在紫外灯下观察并拍照。

1.5 RAPD 条带分析和数据处理

在记录 RAPD 分析过程中, 位点的取舍不能根据带的强弱, 重复性好是最重要的取舍标准。不同种间随机多态 DNA 片段相似性计算根据 Jaccard 公式^[8]。

RAPD 扩增带有无分别用“1”和“0”表示, 建立数据库文件。利用 NTSYS (2.10 版) 软件进行统计分析, 根据遗传距离采用不加权算术平均法进行聚类分析, 建立聚类分析树状图^[9]。

2 结果分析与讨论

2.1 引物的筛选和 RAPD 多态性

对购自北京赛百盛公司的 37 条 10 碱基随机引物进行筛选, 选出 6 条扩增产物较多、谱带清晰、多态性较好的引物用于 RAPD 扩增, 分别是 A15、B10、B15、C20、D12、D15。其中 D15 对 23 个样品具有很好的多态性, 因此将其作为样品鉴定的有效引物 (表 2、图 1)。

由表 2、图 1 可见, 37 个随机引物对 23 个竹种扩增, 其中 6 个引物扩增的电泳图谱较清晰, 均能反映出试验材料基因组的多态性。共获得 47 个位点 DNA 扩增片段, 大小 0.3 ~ 1.05 kb, 其中 44 个位点具有多态性, 高达 93.6%。平均每条引物扩增出 7.8 条带, 7.3 条多态性带, 引物 A15 扩增出, 多态性条带最多, 占总数的 20.45%。

以上结果表明, 同属不同种间有极其丰富的遗传多样性, 且各种间具有一定差异性, 这符合刚竹属竹种地理分布广泛的事实。

表 2 6 个引物扩增结果

引物 Primer	碱基序列 (5' ~ 3') The sequence of the primer	总条带 数 Total amplified bands	公共条带 数 Common amplified bands	多态条带 数 The polymorphic bands	多态性 Percentage of polymorphic bands (%)
A15	TTCCGAACCC	9	0	9	100
B10	GTGCTGGGAC	7	0	7	100
B15	GGAGGGTGTT	8	0	8	100
C20	ACTTCGCCAC	6	2	4	66.7
D12	CACCGTATCC	8	0	8	100
D15	CATCCGTGCT	9	1	8	88.9
合计 Total		47	3	44	93.6

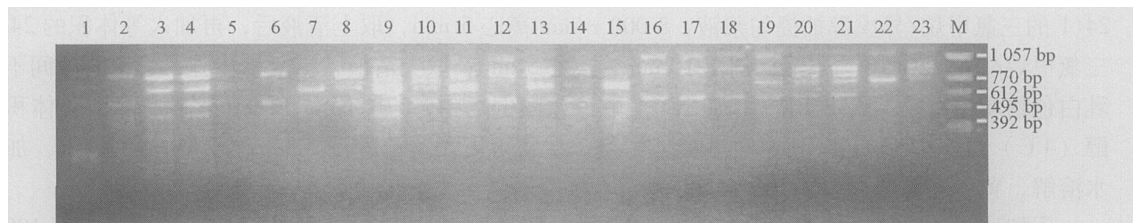


图 1 随机引物 D15 扩增的 23 个竹种 DNA 图谱

M: DNA marker, 1 ~ 23: 样品 1 ~ 23, 下同。

Fig 1 Amplified profile of primer D15 for 23 ornamental bamboo species

M: DNA marker, 1 - 23: Sample 1 - 23, the same below.

2.2 种间遗传相似聚类分析

由表 3 可见, 23 个观赏竹种的平均遗传距离为 0.4073, 变异幅度在 0.0870 ~ 0.7587。遗传距离和变异幅度均较大, 进一步说明它们具有较高的遗传多样性。

按传统形态分类学观点, 同一种的变型种或栽培种之间遗传距离较小, 不同种间遗传距离较大。本试验结果也证明此结论基本正确。如毛竹的 4 个变型种强竹、黄槽毛竹、花毛竹和龟甲竹的遗传距离在 0.0870 ~ 0.2123, 金镶玉竹和黄秆京竹为 0.1272, 人面竹与乌哺鸡竹变型种的黄纹竹和水竹组的黎子竹间的遗传距离都为 0.7035, 说明它们之间的亲缘关系较远。以上证明了利用分子标记手段检测种间遗传多样性的可靠性。

根据遗传距离将 23 个竹种分为 L1 和 L2 两个层面。L1 处遗传距离为 0.4492, 可将 23 个竹种分

表 3 根据 RAPD 数据计算的 23 个试验材料的遗传距离矩阵

Table 3 Genetic distance of the 23 examined materials on 47 RAPD bands

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	0.0000																						
2	0.5871	0.0000																					
3	0.3435	0.4242	0.0000																				
4	0.3213	0.2842	0.2801	0.0000																			
5	0.4808	0.2324	0.5076	0.3602	0.0000																		
6	0.4559	0.2365	0.4266	0.2708	0.2554	0.0000																	
7	0.4048	0.2624	0.3064	0.2301	0.2324	0.3543	0.0000																
8	0.5258	0.4887	0.4964	0.2801	0.2712	0.4266	0.4242	0.0000															
9	0.6931	0.2506	0.5258	0.3784	0.2695	0.3914	0.3507	0.3435	0.0000														
10	0.4825	0.3849	0.2664	0.3013	0.4037	0.3143	0.3277	0.5177	0.4219	0.0000													
11	0.4387	0.1680	0.3944	0.2668	0.1460	0.2704	0.1272	0.2890	0.2050	0.3103	0.0000												
12	0.4006	0.2524	0.3629	0.3407	0.2712	0.2930	0.2524	0.3629	0.5258	0.4487	0.2890	0.0000											
13	0.7035	0.4433	0.4510	0.5829	0.3370	0.4552	0.3787	0.4510	0.4803	0.3387	0.3489	0.4510	0.0000										
14	0.4559	0.4879	0.3576	0.4784	0.3126	0.5108	0.3543	0.3576	0.3308	0.4478	0.3816	0.4266	0.3121	0.0000									
15	0.5352	0.4181	0.3568	0.3346	0.2939	0.2869	0.2750	0.2827	0.3811	0.4581	0.3630	0.3568	0.3914	0.2128	0.0000								
16	0.5471	0.2736	0.3842	0.3620	0.2412	0.3788	0.2736	0.3842	0.4219	0.2877	0.2615	0.2123	0.3387	0.4478	0.3040	0.0000							
17	0.5471	0.2736	0.3236	0.3620	0.2925	0.4478	0.3277	0.3842	0.4825	0.4055	0.3103	0.1610	0.4032	0.4478	0.3781	0.0870	0.0000						
18	0.6161	0.2736	0.3842	0.4265	0.2412	0.3788	0.3849	0.3842	0.3648	0.4055	0.3103	0.2123	0.4032	0.3788	0.3781	0.1335	0.0870	0.0000					
19	0.6242	0.4048	0.4613	0.5726	0.2695	0.5990	0.4619	0.4613	0.3365	0.4825	0.3874	0.5258	0.4158	0.3914	0.5352	0.4219	0.3648	0.3107	0.0000				
20	0.5871	0.4249	0.5577	0.4665	0.2812	0.4879	0.3677	0.3636	0.3507	0.5790	0.2550	0.5577	0.5123	0.4879	0.4181	0.4455	0.3849	0.3849	0.2506	0.0000			
21	0.7035	0.5123	0.5251	0.5829	0.3976	0.5352	0.5123	0.5251	0.4803	0.6264	0.3489	0.6051	0.4055	0.6222	0.5737	0.5463	0.4722	0.4722	0.2980	0.1556	0.0000		
22	0.6365	0.2940	0.5381	0.5159	0.3129	0.6224	0.4053	0.4691	0.3852	0.4904	0.2819	0.5381	0.4236	0.3993	0.6609	0.4259	0.3653	0.3653	0.2798	0.4053	0.4236	0.0000	
23	0.4303	0.7034	0.5551	0.4528	0.5552	0.6675	0.3932	0.6421	0.7404	0.5763	0.4812	0.6421	0.6919	0.6675	0.5237	0.4963	0.5763	0.7587	0.4993	0.3287	0.4295	0.5968	0.0000

成 3 类 (图 2), 即第 1 类: 人面竹、乌哺鸡竹; 第 2 类: 紫竹、黄槽石绿竹、金镶玉竹、黄秆京竹、京竹、绿皮黄筋竹、毛金竹、强竹、黄槽毛竹、花毛竹、龟甲竹、黄皮绿槽竹、云和乌哺鸡竹、黄槽竹、筠竹、斑竹、黎子竹; 第 3 类: 黄条早竹、黄秆乌哺鸡竹、黄纹竹、旱竹。

L2 处遗传距离为 0.3310, 将 23 个竹种分成 9 类, 即第 1 类: 人面竹; 第 2 类: 乌哺鸡竹; 第 3 类: 紫竹、黄槽石绿竹、金镶玉竹、黄秆京竹、京竹、绿皮黄筋竹、毛金竹; 第 4 类: 强竹、黄槽毛竹、花毛竹、龟甲竹; 第 5 类: 黄皮绿槽竹、云和乌哺鸡竹、黄槽竹; 第 6 类: 筠竹、斑竹; 第 7 类: 黎子竹; 第 8 类: 黄条早竹、黄秆乌哺鸡竹、黄纹竹; 第 9 类: 旱竹。

此结果证实了竹种与其变型种聚为一类, 表明种内和种间关系的树系图与形态分类的结果基本吻合, 但其中个别竹种出现了不同结果, 如, 黄秆乌哺鸡、黄纹竹与原变栽培型乌哺鸡没有聚在一类, 而与黄条早竹和旱竹聚为一类, 说明黄条早竹、黄秆乌哺鸡竹、黄纹竹、旱竹可能是由乌哺鸡竹进化而来; 又如乌哺鸡竹没有与其变型种聚在一起, 而是与人面竹聚在一起, 这与种和其变型种聚为一类的结论不符。

《中国植物志》中属于水竹组的黎子竹并没有与其它 22 个属于刚竹组的种或变型种有明显的区别, 而是与它们遗传距离较近, 表明其亲缘关系较近。这是本试验得出的不同于形态分类学的结果, 有待进一步研究。

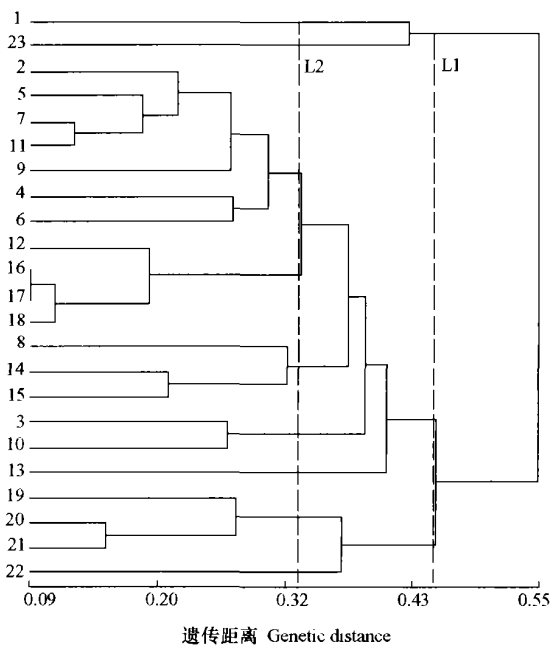


图 2 23 个竹种遗传距离聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram based on the genetic distance matrices constructed by the method of UPGMA

总之, 聚类结果基本符合吴海清等 (1997) 对刚竹属植物地下茎的比较解剖学研究的结果, 说明 RAPD 技术用于分析属内竹种间、种下级之间遗传多样性和亲缘关系有较高的精确性和可靠性, 但个别竹种有待深入研究。

参考文献:

- 1 赵奇僧, 汤庚国. 中国竹子分类的现状和问题. 南京林业大学学报 (自然科学版), 1993, 17 (4): 1~8
Zhao Q S, Tang G G. The present status and problems of bamboo classification in China. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 1993, 17 (4): 1~8 (in Chinese)
- 2 秦贺兰, 游捷, 高俊平. 菊花 18 个品种的 RAPD 分析. 园艺学报, 2002, 29 (5): 488~490
Qin H L, You J, Gao J P. RAPD analysis of 18 *Chrysanthemum* cultivars. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (5): 488~490 (in Chinese)
- 3 杨光耀, 赵奇僧. 苦竹类植物 RAPD 分析及其系统意义. 江西农业大学学报, 2000, 22 (4): 551~553
Yang G Y, Zhao Q S. Phylogenetic Relationships among five *pleioblastus* species (Bambusoideae) from China and Japan based on random amplified polymorphic DNA. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2000, 22 (4): 551~553 (in Chinese)
- 4 方伟, 何祯祥, 黄坚钦, 史钱均, 林新春. 雷竹不同栽培类型 RAPD 分子标记的研究. 浙江林学院学报, 2001, 18 (1): 1~5
Fang W, He Z X, Huang J Q, Shi Q J, Lin X C. Studies on cultivars of *Phyllostachys paxcox* with RAPD molecular markers. Journal of Zhejiang Forestry College, 2001, 18 (1): 1~5 (in Chinese)
- 5 师丽华, 杨光耀, 林新春, 郭起荣. 毛竹种下等级的 RAPD 研究. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2002, 26 (3): 65~68
Shi L H, Yang G Y, Lin X C, Guo Q R. RAPD studies on the grade of infra-species of *Phyllostachys edulis*. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2002, 26 (3): 65~68 (in Chinese)
- 6 杨光耀, 赵奇僧. 用 RAPD 分子标记探讨倭竹族的属间关系. 竹子研究汇刊, 2001, 20 (2): 1~5
Yang G Y, Zhao Q S. RAPD studies on intergeneric relationships in *Shibataeae* Nakai emend Keng f. (Gramineae, Bambusoideae). Journal of Bamboo Research, 2001, 20 (2): 1~5 (in Chinese)
- 7 吴益民, 黄纯农, 王君晖. 四种竹子的 RAPD 指纹图谱的初步研究. 竹子研究汇刊, 1998, 17 (3): 10~13
Wu Y M, Huang C N, Wang J H. Primary study on the RAPD fingerprinting do four bamboo species. Journal of Bamboo Research, 1998, (3): 10~13 (in Chinese)
- 8 Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc. Vaud Sci Nat, 1908, 44: 223
- 9 周志钦, 李育农, 王力超. 11 种野生苹果种质资源 RAPD 标记研究. 西南农业大学学报, 1998, 20 (1): 34~37
Zhou Z Q, Li Y N, Wang L C. A preliminary study on RAPD markers of wild species in *Malus* Mill. Journal of Southwest Agricultural University, 1998, 20 (1): 34~37 (in Chinese)

新书推荐

《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编, 已于 2002 年 9 月出版发行。全书分上、下卷, 1~6 章为上卷, 包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类, 计 2263 个品种, 1347 页; 7~12 章为下卷, 包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类, 计 2550 个品种, 1177 页。入志的品种中, 地方品种占 90% 以上, 少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。本书较全面系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源概貌、研究成果及育种水平, 可供蔬菜科研、教学、生产及种子单位、农业行政单位的人员参考。本书出版后受到读者普遍好评, 现尚有少量存书, 特以优惠价格 490 元 (上、下卷) 提供给读者 (原价 980 元)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。