

泡桐属七种植物的 RAPD 分析

卢龙斗, 谢龙旭, 杜启艳, 常重杰

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453002)

摘要: 利用 13 个 10 mer 的随机引物对中国泡桐属的 7 个种进行了 RAPD 分析, 对扩增形成的谱带进行了对比, 发现 7 个种间存在较丰富的多态性带纹。经用 UPGMA 法聚类结果说明可把研究的 7 个种分成 2 个类群。其中白花泡桐与川泡桐亲缘关系最近, 二者与揪叶泡桐、南方泡桐、山明泡桐归为 1 个类群。毛泡桐与兰考泡桐亲缘关系也较近, 二者在系统演化上比较原始, 归为 1 个类群。

关键词: RAPD 分析; 泡桐属; 聚类分析

中图分类号: Q949.777.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)04-0335-04

RAPD analysis of seven species in *Paulownia*

LU Long-dou, XIE Long-xu, DU Qi-yan, CHANG Zhong-jie

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The genomic DNA of seven species in *Paulownia* was amplified with 13 primers of 10 mer length. Abundant polymorphic DNA makers were detected among seven species, when compared the bands amplified. The cluster analysis with UPGMA suggested that the seven species studied belong to two lineages. Of which, the relationship between *P. fortunei* (Seem.) Hemsl. and *P. fargesii* Franch. is the closest. These two species, along with *P. australis* Gong Tong and *P. lamprophylla*, belong to one clade, *P. tomentosa* (Thunb.) Steud. and *P. elongata* S. Y. Hu have closer relationship, which are relatively primitive, belong to the other clade.

Key words: RAPD analysis; *Paulownia*; cluster analysis

泡桐属 (*Paulownia*) 植物是重要速生经济林木, 原产我国, 且多分布于河南中原地区。现有 9 个种和 4 个变种。由于其材质优良, 叶、花、果、树皮又可入药, 因此, 在国民经济中占有重要地位^[1,2]。关于泡桐属植物的栽培、育种以及依据外部形态指标进行的种间亲缘关系探讨已有人做了比较深入的研究^[3]。但在分子水平上进行泡桐属植物的系统分类地位、种与种间的亲缘关系的研究还未见有报导。本文旨在利用 RAPD 分子标记, 在分子水平探讨该属植物种间的亲缘关系, 为该属植物的系统分类和遗传育

种提供理论基础和参考数据。

1 材料和方法

1.1 材料

毛泡桐 (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.)、兰考泡桐 (*Paulownia elongata* S. Y. Hu)、白花泡桐 (*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.)、川泡桐 (*Paulownia fargesii* Franch.)、山明泡桐 (*Paulownia lamprophylla*)、揪叶泡桐 (*Paulownia catalpifolia* Gong Tong)、南方泡桐 (*Paulownia australis* Gong

收稿日期: 2000-07-27

作者简介: 卢龙斗 (1954-), 男, 河南宜阳人, 教授, 从事遗传学教学与科研工作。

基金项目: 河南省科委自然科学基金资助项目 (批准号: 971018000)

Tong)7个种均采自河南农业大学泡桐研究基地。每个种选取3个个体幼嫩叶片,于冰壶中带回实验室备用。

1.2 DNA提取和纯化

每个种取1.0g新鲜幼嫩叶片,用液氮研磨成粉末后加10mL 60℃的CTAB分离缓冲液,保温1h,然后加等体积的氯仿-异戊醇,混匀后8000 r/min离心10 min,在取的上清液中加入2/3体积的预冷异丙醇,混合均匀沉淀出DNA,用洗涤液处理20 min后挑出沉淀物干燥,最后溶于适量TE液中。

1.3 RAPD检测

用于该实验的随机引物为美国Operon Technologies公司生产的S组20种寡聚核苷酸片断(引物序列见表1)。Taq酶和dNTP均为华美生物工程有限公司产品。反应混合物用20 μL石蜡油覆盖。反应体系为:引物1 μL, dNTP 100 μmol, MgCl₂ 1.5 mmol/L, Taq酶1U,基因组DNA 200 ng。循环参数为:94℃预变性30 s, 36℃退火60 s, 72℃延伸

60 s,扩增45个循环,最后72℃延伸5 min,扩增产物在1.4%琼脂糖凝胶上电泳,经EB染色后在紫外灯上观察拍照。

表1 泡桐属植物RAPD分析所用的13个引物

Table 1 Thirteen primers used for RAPD analysis of the plant of *Paulownia*

引物名称 Name of the primers	序列(5'~3') Sequence	扩增带型数 Number of amplified bands	多态性带型数 Number of polymorphic bands
S422	CCGTACGGAC	6	5
S423	TTCAGGGCAC	6	4
S424	TATGGTCCGG	6	3
S425	CTGAAGCGGA	9	6
S427	AGGATCAAGC	9	7
S428	GACTGGGAGT	6	6
S431	CAAAGCGCTC	5	3
S433	ACGCGCATGT	12	11
S434	CGCCCCAGTA	5	3
S436	ACACCGGAAC	8	5
S439	TGACGTCCAA	5	3
S440	TAGCCCAGTA	8	5
S544	TCACGTCCAC	4	2
总数 Total	13	89	63 (70.79%)

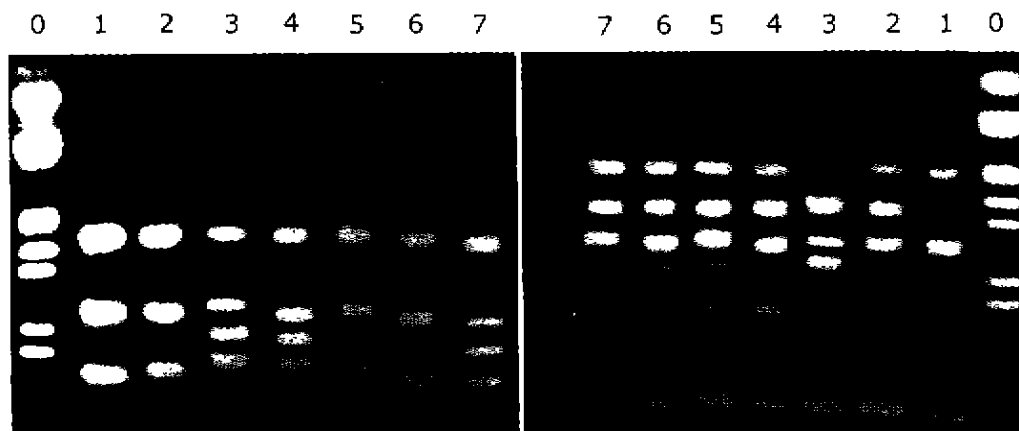


图1 随机引物S433, S424扩增产物

Fig. 1 Amplification products of primer S433, S424

2 结果

2.1 RAPD遗传标记

从S组20个引物中筛选出了13个能扩增出清晰的谱带的引物,并利用这些引物对泡桐属的7个种进行了RAPD扩增。同样条件的扩增重复一次,得到了基本上相同的结果,说明有很好的重复性。扩增片段的大小大约在2.2~0.30 kb之间。对每一个引物在7个种扩增的谱带数的类型进行统计,并对多态性带型数也进行了统计,得出表1的结果。统计中对个别不太清晰和个别不稳定的带型没有计

入统计结果。

2.2 各种间遗传距离和聚类结果

根据电泳谱带(图1),分别统计13个引物在各个种扩增的DNA谱带数目以及种与种之间共有DNA谱带数目,再根据这些数据算出各个种之间的遗传距离(表2)。任意2个种间的遗传距离 $P=1-F$, F 为2个种的共享度,公式为 $F=2N_{ab}/(N_a+N_b)$, N_a 和 N_b 分别为a、b两种各自拥有的RAPD标记数, N_{ab} 为ab两个种共同拥有的RAPD标记数。根据遗传距离P值再用UPGMA法进行聚类,构建树系图(图2)。

表 2 任意两个种间的遗传距离、RAPD 图谱中共同的片段数和扩增片段总数

Table 2 Genetic distances between any two species, the numbers of the shared fragments and the total numbers of fragments amplified in RAPD patterns

	1	2	3	4	5	6	7
1		0.368	0.531	0.510	0.435	0.551	0.465
2	24/76		0.277	0.380	0.468	0.341	0.477
3	19/81	30/83		0.200	0.394	0.312	0.334
4	24/98	31/100	42/105		0.259	0.257	0.310
5	26/92	25/94	30/99	43/116		0.364	0.404
6	20/89	30/91	33/96	42/113	34/107		0.347
7	23/86	23/88	31/93	38/110	31/104	33/101	

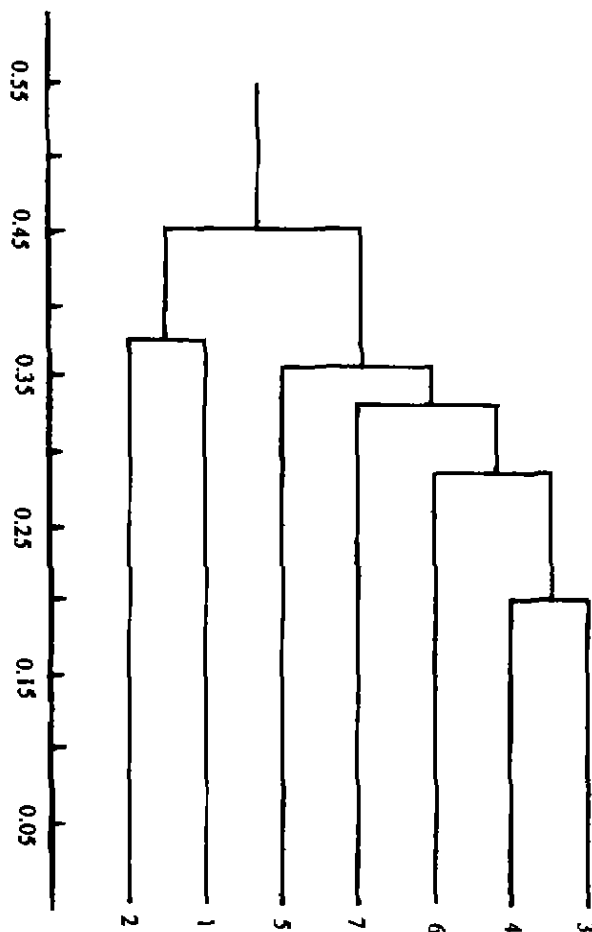


图 2 应用 UPGMA 法构建的树系图

Fig. 2 Dendrogram generated using UPGMA algorithm

表 2、图 1、图 2 中: 0-marker; 1-毛泡桐; 2-兰考泡桐; 3-白花泡桐; 4-川泡桐; 5-山明泡桐; 6-揪叶泡桐; 7-南方泡桐。

3 讨论

3.1 DNA 多态性

从表 1 可看到引物 S428 对 7 个种共扩增出 6 条 DNA 谱带,其中多态性谱带 6 条,占 100%。引物 S433 对 7 个种共扩增出 12 条 DNA 谱带,其中多态

性谱带就有 11 条,占 92%,引物 S427 对 7 个种共扩增出 9 条 DNA 谱带,其中多态性谱带有 7 条,占 78%。每一个引物对 7 个种扩增出的 DNA 谱带数其多态性带型数都占 50%以上。13 个引物共扩增出 89 条不同分子量的谱带,其中有 63 条表现为多态性谱带,占总数的 70.79%,这些说明泡桐属植物不同的种之间存在非常丰富的 DNA 多态性。泡桐属植物外部形态相似,非专业人员很难正确区分各个种。最早人们主要以花冠颜色、叶背绒毛的稀疏为依据,但这些特征又不稳定,应用上非常困难,以致于有人把泡桐属植物分成 9 个种,有的定为 7 个种,有的定为 5 个种,也有人定为 3 个种,其它的都是一些变种。根据得到的种与种之间的遗传距离,种与种之间存在的丰富的 DNA 多态性,我们认为把泡桐属植物定为 9 个种是有一定科学依据的。

3.2 聚类结果与种间的亲缘关系分析

图 2 显示了泡桐属 7 个种的树系图。从中可看到 7 个种可以合成 2 个类群。白花泡桐、川泡桐、南方泡桐、揪叶泡桐、山明泡桐为一类群,其中白花泡桐与川泡桐遗传距离最近,仅为 0.200,所以二者在 0.200 处首先聚类,说明二者亲缘关系最近。另一类群包括毛泡桐、兰考泡桐,二者遗传距离为 0.368,亲缘关系也较近。第一类群与第二类群在 0.444 处聚类。从表 2 可看出毛泡桐与其它各个种间的遗传距离都比较远,界于 0.368~0.551 间,因此,在分析的 7 个种中毛泡桐比较原始。这些与龚本海 1994 年的研究结果相一致^[4]。无论在传统的系统分类水平的研究^[2,15],还是在同工酶水平的研究^[4],以及在细胞水平上进行的研究^[7]都认为毛泡桐比较原始,我们在分子水平的研究结果也证明了这一点。关于兰考泡桐是否也比较原始,各研究者有不同的看法,有待于进一步研究。

3.3 种间性状与遗传距离分析

泡桐属植物各个种间有很多相似的性状,如都为落叶乔木,圆锥或伞形树冠,叶心脏形大而有柄,无托叶,圆锥花序等。因此,较难从外部形态上区分各个种之间的差别。各个种的染色体数目都为 40 条,也都为小染色体^[5],所以在染色体核型上也很难鉴定各个种间的亲缘关系。中国植物志、河南植物志根据各个种生殖器官的特征编制的检索表,可以看到各个种间存在一些差异。我国著名的泡桐研究

方面的专家蒋建平等认为台湾泡桐、白花泡桐、毛泡桐、川泡桐分布较广,种间差异较大,结籽力强,而其它几个种分布区域小,种间差异小,外部形态接近,介于以上4个种之间^[1]。从表2中可看到白花泡桐、毛泡桐、川泡桐相互之间遗传距离较大,如毛泡桐与白花泡桐间为0.531,毛泡桐与川泡桐间为0.510。而兰考泡桐、山明泡桐、揪叶泡桐、南方泡桐间遗传距离较小,介于0.341~0.477之间。这些分子水平上的研究结果与各种间外部形态方面的相似性是比较吻合的。但是,在表2中可看到白花泡桐和川泡桐的遗传距离仅0.200,且在树系图中首先聚类,这个结果与两个种间外部形态差异较大是不吻合的,这也许是实验数据上的误差,不过,从这两种泡桐都分布在南方区域,遗传距离较小也是正常的。兰考泡桐与揪叶泡桐、南方泡桐与白花泡桐在外部形态上比较相似^[1],在表2中可看到,兰考泡桐与揪叶泡桐间遗传距离较小为0.341,南方泡桐与白花泡桐间也比较小为0.334。

1995年熊金桥等分析了泡桐属植物的38个性状^[2],并用数量分类的方法对所分析的12个种或变种进行了系统聚类分析,把该属植物分成三个组,白花泡桐组:白花泡桐、兰考泡桐等;毛泡桐组:毛泡桐、川泡桐、南方泡桐等;揪叶泡桐组:揪叶泡桐、山明泡桐等。在我们的研究结果中虽然白花泡桐与兰考泡桐没有归入同一个组中,但从表2可以看出二者的遗传距离也比较近,仅0.277,这与熊金桥等人的研究结果基本相符。揪叶泡桐与山明泡桐的遗传距离0.364,亲缘关系也较近,这与熊金桥等人的研究也基本一致。但毛泡桐与川泡桐,毛泡桐与南方泡桐的遗传距离都相应较远,与熊金桥等人的研究结果不一致。我们认为个别外部形态上的一致不能说明亲缘关系就近,而只有分子水平上的相似才能代表亲缘关系的远近。当然,我们的研究仅用了20种引物,还不足以从分子水平上说明问题。另外,分析外部形态、指标得出的遗传距离与分析分子标记得出的遗传距离二者之间对比的可靠性和科学性也有待于进一步探索。关于鄂川泡桐(*P. al-biphloea*)、台湾泡桐(*P. kawakamii*)以及其它几个变种与所研究的7个种的遗传距离、种间亲缘关系,由于材料所限,我们没作研究,这些有待于进一步探索和补充。

3.4 种的地理分布与遗传距离分析

泡桐属植物在我国分布比较广泛,西起成都、西安,东至沿海,北起辽宁、山东,南至云南边境。从表2中可以看到聚类在一大类群,分布在河南、河北较靠近北方的毛泡桐与兰考泡桐的遗传距离最小,仅0.368。毛泡桐与仅分布在湖北襄阳一带的山明泡桐间遗传距离为0.435,趋于中间。而毛泡桐与分布在南方的几个种间遗传距离都较大,如毛泡桐与白花泡桐间为0.531,与川泡桐间为0.510,与南方泡桐间为0.465。毛泡桐与分布在山东的揪叶泡桐间为0.551。从以上结果可以看出泡桐属各个种间在地理分布上相距越远,遗传距离越大,种间差异越明显。也证明泡桐属植物从原始种演化到今天的多个种的过程中地理环境条件起了很大的作用。

根据竺肇华的观点^[3]认为南方泡桐可能是台湾泡桐与白花泡桐的杂交种,兰考泡桐可能是毛泡桐与白花泡桐的杂交种。从地理分布上看,台湾泡桐与白花泡桐有重叠区,毛泡桐与白花泡桐有重叠区。南方泡桐、兰考泡桐又都是高度不育。在我们的实验结果中南方泡桐与白花泡桐的遗传距离较小,仅0.334。毛泡桐与白花泡桐间遗传距离仅0.277,说明白花泡桐对兰考泡桐形成提供的遗传份额比较大。这些在分子水平的数据支持了竺肇华的观点,证明在泡桐属植物演化过程中种间杂交也是重要因素之一。

参考文献:

- [1] 中国科学院泡桐调查组. 泡桐研究[M]. 北京: 农业出版社, 1980. 18-22.
- [2] 陈志远. 泡桐属分类管见[J]. 华中农业大学学报, 1986, 5(3): 261-265.
- [3] 熊金桥. 泡桐属的数量分类研究[J]. 植物研究, 1992, 12(2): 185-188.
- [4] 龚本海. 泡桐属植物SOD同工酶和可溶性蛋白质分析[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(5): 527-529.
- [5] 卢龙斗, 谢龙旭, 孙富丛, 等. 泡桐属植物花粉形态研究[J]. 河南师范大学学报, 1999, 27(4): 51-54.
- [6] 于兆英, 李思锋, 徐光远, 等. 泡桐属植物染色体数目和形态的初步研究[J]. 西北植物学报, 1987, 7(2): 127-133.
- [7] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(67卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1979. 33-40.
- [8] 泡桐文集编委会. 泡桐文集[C]. 北京: 中国林业出版社, 1982. 1-10.