

文章编号: 1001-1498(2008)03-0391-06

# 川西南 13种报春花属植物亲缘关系的 RAPD 分析

潘远智<sup>1,2</sup>, 庞博<sup>2</sup>, 孙振元<sup>1\*</sup>, 陈强<sup>2</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 四川农业大学林学院园艺学院, 四川雅安 625014)

**摘要:** 利用 RAPD 标记对采自四川西南的龙池、康定、木格措和理塘等地的 13 种报春花属植物亲缘关系进行了分析。结果表明: 28 个引物从 85 份材料中共扩增出 250 条 DNA 带, 大小约为 130 ~ 1 800 bp, 每个引物可扩增 4 ~ 15 条, 平均扩增 9 条, 其中多态性带为 209 条 (83.6%); 材料间平均遗传距离为 0.660 2; 采用 UPGMA 法可将供试材料聚为 4 类, 除中甸海水仙、雅砻粉报春、卵叶报春和高穗花报春各自聚在一起外, 其余种均不能完全区分开。研究结果更支持将偏花报春归为灯台报春组, 而粉报春组和脆蒴报春组均与其它报春组间差异较明显。聚类可以区分龙池居群与康定、木格措和理塘居群, 但不能区分后三者, 可见不同生态地理类型对报春花遗传多样性影响较大。

**关键词:** 报春花属; 遗传距离; RAPD; 亲缘关系; 遗传多样性

中图分类号: S682.1<sup>+</sup>5

文献标识码: A

## Phylogenetic Relationship Analysis among 13 Species of *Primula* L. in South-west Sichuan Using RAPD Marker

PAN Yuan-zhi<sup>1,2</sup>, PANG Bo<sup>2</sup>, SUN Zhen-yuan<sup>1\*</sup>, CHEN Qiang<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Forestry, CAF; Key Laboratory of Tree Breeding Cultivation, State Forestry Administration,

Beijing 100091, China; 2. College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

**Abstract:** Using RAPD, the phylogenetic relationship of *Primula* L. from Longchi, Kangding, Mugecuo and Litang populations was studied. The results indicated that 250 DNA fragments, which ranged from 130 bp to 1 800 bp, were amplified based on 28 RAPD primers, 209 polymorphic fragments (83.6%) were detected, and the average number of DNA fragments per primer was 9. The mean of genetic distance was 0.660 2. The dendrogram generated by UPGMA clustered all the 85 materials into 4 groups. Except *P. vialii*, *P. prattii*, *P. monticola* and *P. ovalifolia*, the other species were not separated each other by the cluster. The result showed that *P. secundiflora* belonged to Sect *Prolifera* was also sustained, and there were distinct difference between Sect *Petiolares* and Sect *Aleuritia* with other sections. The dendrogram indicated that Longchi population was separated for Kangding, Mugecho and Litang populations, but the latter three populations were not distinguished each other. This suggested the eco-geographic characteristics significantly influenced the genetic diversity of *Primula* L.

**Key words:** *Primula* L.; genetic distance; RAPD; phylogenetic relationship; genetic diversity

报春花被誉为三大高山花卉之一。报春花属植物约有 500 多种, 多为二年或多年生草本, 主要分布于北半球温带高山地区, 我国有 293 种, 主产于川滇

藏、陕西、贵州次之。前人对报春花属植物的遗传多样性及资源保护等方面进行了一些研究<sup>[1-4]</sup>, 但仅局限于少数的种类。四川省境内有报春花属植物

收稿日期: 2007-12-04

基金项目: 四川省教育厅基金项目 (2005A002)

作者简介: 潘远智 (1969—), 男, 四川达县人, 副教授, 主要从事园林植物栽培与育种研究。

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: sunzy@caf.ac.cn

121种 9亚种和 3变种,许多是四川特有种。因此,加大对本属植物的相关研究显得十分重要和迫切。

在集中调查都江堰龙池、康定——哲多山——新都桥、木格措及塔公草原、理塘等地的报春花资源基础上,采用 RAPD 分子标记技术,对分布于其中的 13种报春花共 85份材料的遗传多样性进行分析,以期揭示其亲缘关系,为开展报春花新品种选育、资源保护和鉴定提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料的采集及保存

13种 85份报春花于 2006年 3—7月分别采自四川省都江堰龙池国家森林公园、康定及理塘(表 1)。活体植株采集后移植于四川农业大学科研农场,常规管理,取嫩叶片置于 -70℃ 冰箱冻存备用。

表 1 试验所用报春花种类及其来源

组别	种名	编号	来源	海拔 /m	生境
粉报春组 ( <i>Aleuritia</i> )	雅江报春 ( <i>P. yargongensis</i> W. W. Smith)	1-4	康定	3 540 ±10	阳坡,河滩草甸
		5-7	木格措	3 800 ±12	阳坡,透光性好的林下及沟边
	雅砻粉报春 ( <i>P. prattii</i> Hensl.)	8-17	理塘	4 360 ±8	阳坡,沟边、灌丛下
		43-44	木格措	3 800 ±17	阴坡,杜鹃林下,湖泊边
球花报春组 ( <i>Denticulata</i> )	球花报春 ( <i>P. denticulate</i> Smith)	18-24	康定	3 340 ±11	阴坡,农田边缘
	中甸海水仙 ( <i>P. monticola</i> Chen et C. M. Hu)	75-77	龙池	1 828 ±15	阳坡,荫庇林下
钟花报春组 ( <i>Sikkimensis</i> )	杂色钟花报春 ( <i>P. alpicola</i> )	25-42	木格措	3 821 ±9	阳坡,小乔木、低矮灌丛下
	钟花报春 ( <i>P. sikkimensis</i> Hook.)	79-80	理塘	4 330 ±9	阳坡,溪流边、小叶杜鹃丛下
灯台报春组 ( <i>Proliferae</i> )	桔红灯台报春 ( <i>P. bulleyana</i> Foor.)	45-49	木格措	3 450 ±17	阳坡,疏林草地、苔藓、腐质层
	偏花报春 ( <i>P. secundiflora</i> Franch.)	81-85	理塘	4 460 ±9	阳坡,溪流边、矮灌丛下
	粉被灯台报春 ( <i>P. pulventula</i> Duthie)	57-60	龙池	1 828 ±15	阳坡,疏林下
脆蒴报春组 ( <i>Petiolaes</i> )	宝兴报春 ( <i>P. moupinensis</i> Franch.)	51-56	龙池	1 868 ±10	阳坡,疏林下、岩石的苔藓层上
	青城报春 ( <i>P. chienii</i> Fang)	61-74	龙池	1 430 ±8	阴坡,乔木林下
	卵叶报春 ( <i>P. ovalifolia</i> Franch.)	78	龙池	1 828 ±15	阴坡,矮灌丛下
穗花报春组 ( <i>Muscarioides</i> )	高穗花报春 ( <i>P. vialii</i> Delavay ex Franch.)	50	木格措	3 810 ±13	阳坡,松树林下、水沟边

### 1.2 DNA提取和 PCR扩增

DNA的提取参照 Lain等<sup>[5]</sup>的方法。扩增体系采用 20 μL 反应体系,模板 DNA 2.0 μL (30~40 ng), 10 × PCR Buffer (含 Mg<sup>2+</sup> 1.5 mmol) 2.0 μL, Taq 酶 (2.5个单位) 0.4 μL, Primer (50 mmol) 0.4 μL, dNTP (10 mmol) 1.8 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 补充至 20 μL。

扩增程序参照张小平和陈明林<sup>[6]</sup>的方法: 95 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 35 退火 50 s, 72 延伸 90 s, 共进行 40个循环,最后一个循环在 72 保持 5 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,经溴乙锭 (EB) 染色,最后在凝胶成像系统中观察拍照。

### 1.3 数据处理

根据扩增电泳条带的有无构建 0-1 矩阵,有则赋值为“1”,无则赋值为“0”,并计算多态性位点百分率:  $p = k / n \times 100\%$  ( $k$  是多态位点数目;  $n$  为统

计的测量位点总数)。利用 0-1 矩阵,采用 Jaccard 法计算供试材料的遗传距离 (GD),按 UPGMA 方法进行聚类分析。数据分析采用 Excel 和 NTSYS-PC 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 扩增

利用 28个 RAPD 引物对供试材料进行分析(图 1)。结果表明,从 85份材料中共扩增出 250条大小为 130~1 800 bp DNA 片段(表 2),其中多态性带 209条,占总数的 83.6%。每个引物可扩增出 4~15 条带,平均扩增出 9条带。引物 R4 扩增条带数最多,共扩增出 15条带,引物 X15 扩增产物最少,仅扩增出 4条带。引物 AC20、E4、T7、T8 所扩增的多态性带比率最高,达 100%;而引物 Q5 多态性比率最低,仅为 60%;这表明报春花属中不同种间存在很大的遗传分化,遗传多样性丰富。

表 2 28个 RAPD 引物及其扩增产物分析

引物编号	序列	扩增位点总数 (多态性位点数)	多态性带 比率 /%	引物编号	序列	扩增位点总数 (多态性位点数)	多态性带 比率 /%
AC20	ACGGAA GTGG	9 (9)	100.0	T1	GGGCCACTCA	9 (7)	77.8
E4	GTGACATGCC	6 (6)	100.0	T7	GCCAGGCTGT	10 (10)	100.0
H6	ACGCATCGCA	10 (8)	80.0	T8	AACGGCGACA	8 (8)	100.0
H7	CTGCATCGTG	8 (7)	87.5	T18	GATGCCAGAC	7 (6)	85.7
H8	GAAACACCCC	9 (7)	77.8	U8	GGCGAAGGTT	7 (6)	85.7
H11	CTCCGCA GT	11 (7)	63.6	U11	AGACCCAGAG	10 (9)	90.0
H15	AA TGCGCAG	6 (5)	83.3	U15	ACGGGCCAGT	12 (10)	83.3
H20	GGGAGACATC	8 (6)	75.0	U20	ACAGCCCCCA	6 (5)	83.3
M6	CTGGGCAACT	10 (9)	90.0	X1	CTGGGCACGA	10 (8)	80.0
M13	GGTGGTCAAG	9 (7)	77.8	X13	ACGGGAGCAA	9 (7)	77.8
Q5	CCGCGTCTTG	10 (6)	60.0	X15	CAGACAA GCC	4 (3)	75.0
Q6	GAGCGCCTTG	9 (8)	88.9	X16	CTCTGTTCGG	8 (6)	75.0
R4	CCCGTAGCAC	15 (13)	89.7	X17	GACACGGACC	11 (9)	81.8
S1	CTACTGCGCT	11 (10)	90.9	S13	GTCGTTCCTG	8 (7)	87.5
				共计		28	250 (209)

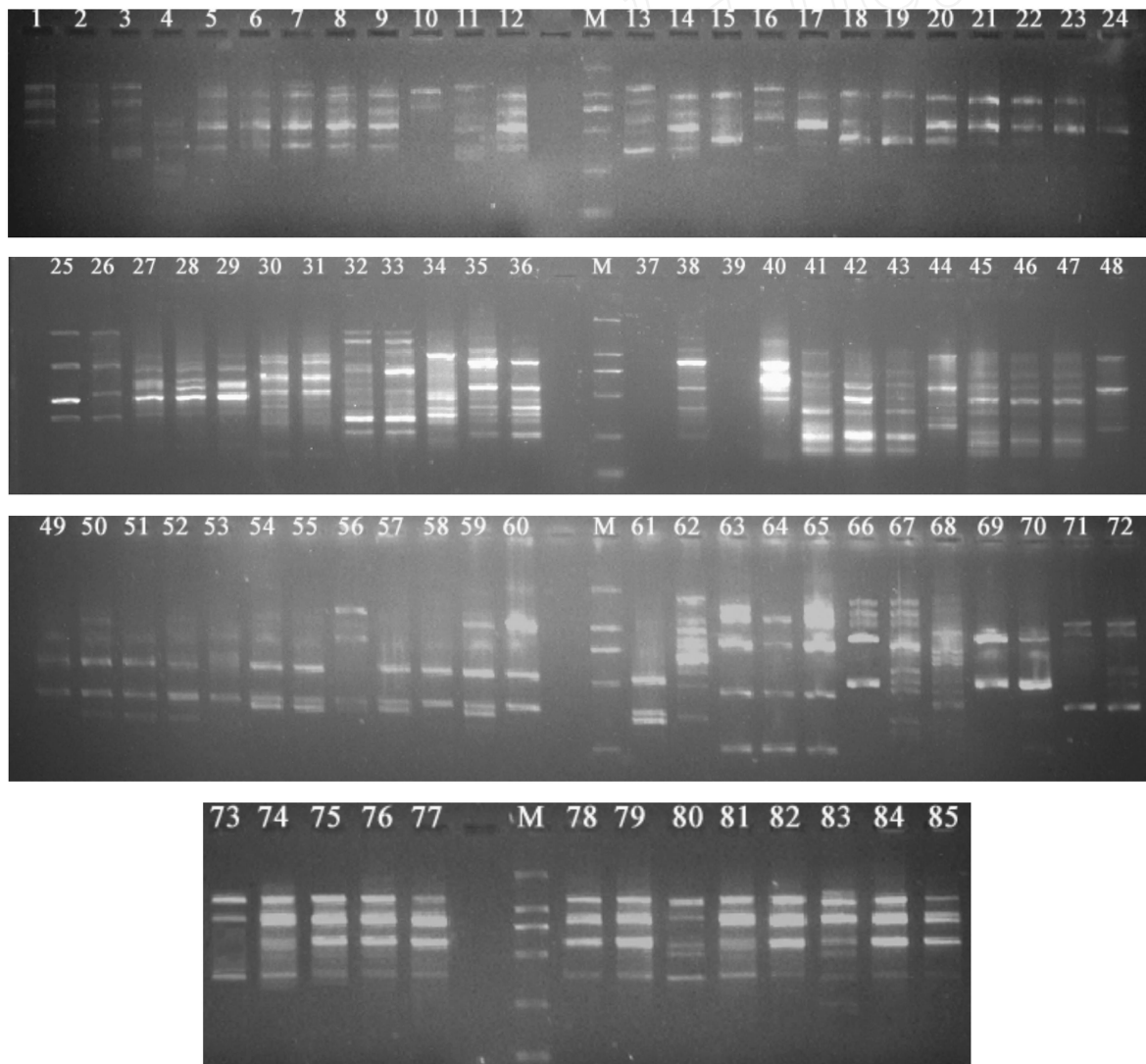


图 1 引物 H11的 RAPD 扩增图谱 (材料编号见表 1)

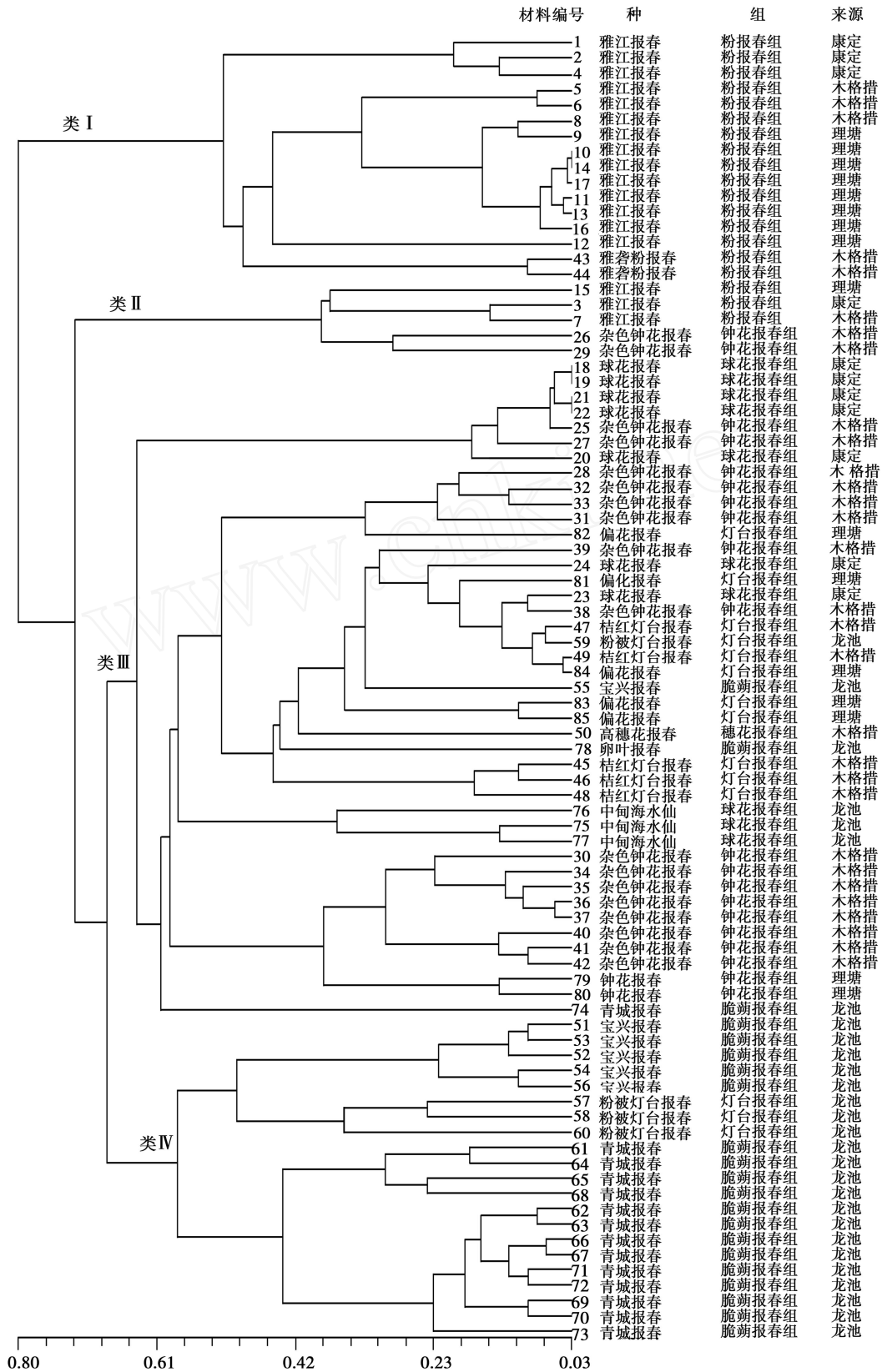


图 2 RAPD 聚类图

2.2 种间聚类分析

85份报春花材料间的平均遗传距离为 0.660 2,

其变幅为 0.034 5 ~ 1.718 6,其中来自理塘的雅江报春材料 10和来自木格措的桔红灯台报春材料 49

的遗传距离最大,而同来自理塘的雅江报春材料 10 和材料 14 的遗传距离最小。以平均遗传距离 0.660 2 为阈值,供试材料可聚为 4 类:类 I 有 16 份材料,包括雅江报春的 14 份材料和雅砻粉报春的 2 份材料;类 II 有 5 份材料,分别为雅江报春的 3 份和杂色钟花报春的 2 份;类 III 共 43 份材料,包括球花报春的 7 份、高穗报春的 1 份、杂色钟花报春的 15 份、偏花报春的 5 份、桔红灯台报春的 5 份、粉被灯台报春的 1 份、宝兴报春的 1 份、卵叶报春的 1 份、雅砻粉报春的 1 份、中甸海水仙的 3 份、钟花报春的 2 份和青城报春的 1 份;类 IV 有 21 份材料,分别为宝兴报春 5 份、粉被灯台报春 3 份和青城报春 13 份。

从聚类结果图 2 也可以看出,类 I 材料是属于粉报春组的雅江报春和雅砻粉报春;类 II 材料分属粉报春组和钟花报春组;而属于球花报春组、钟花报春组和穗花报春组的材料全部聚在类 III;类 IV 中除 3 份材料属灯台报春组外,其余材料均属脆蒴报春组。

### 2.3 不同生态地理区域报春花遗传多样性

对 85 份材料按照其各自的地理来源进行遗传距离的分析(表 3),甘孜州的报春花分属 5 个组的 8 种,含康定、理塘和木格措 3 个采样点;采自龙池的报春花分属 3 个组的 5 种(表 1)。以采样点划分的较小地理范围来看,木格措采样点的材料间遗传距离变幅和平均遗传距离最大;康定采样点的材料间遗传距离变幅和平均遗传距离最小;龙池和理塘采样点居中,说明木格措采样点的材料间遗传分化最大,康定采样点的材料间遗传分化最小;以四川盆地低山丘陵(龙池)和高原地区(甘孜州)划分的大区域来看,甘孜州的报春花具有更明显的遗传差异,不同种的报春花材料间存在着较高的遗传分化,说明该地区的报春花具有较高的遗传多样性。

表 3 不同地理区域报春花的遗传距离

地理种群	材料间遗传距离变幅	平均遗传距离
龙池	0.070 6~1.241 6	0.534 7
康定	0.034 5~0.876 3	0.427 3
木格措	0.034 5~1.614 9	0.548 2
理塘	0.058 4~1.369 5	0.534 7
甘孜州(康定、理塘、木格措)	0.034 5~1.718 6	0.638 1

## 3 结论与讨论

本研究所用的 85 份材料均采自天然居群,分属于川西南的龙池、木格措、康定和理塘 15 个居群共

采集到 13 种报春花属植物,分属 6 个组。28 个 RAPD 引物共扩增出 250 条带,其中多态性带占 83.6%,表明川西南报春花属植物在 DNA 水平上具有丰富的遗传多样性,同时也表明该标记技术可以有效地运用于报春花属植物的遗传多样性研究。

报春花是典型的异花授粉植物,具有“两型花”现象。Weller 等<sup>[7]</sup>认为,异型花植物的遗传多样性显著高于自花授粉植物,说明异型花植物种间和种内发生遗传变异的机率较大。聚类结果显示,85 份供试材料中存在同种报春花不同的材料不能聚在一起的现象,如:雅江报春有 2 个材料聚在了类 III,青城报春 1 个材料聚在类 II,类似的情况在球花报春、杂色钟花报春等材料中也存在。出现这种情况的原因,除了异型花特殊的繁殖体系导致遗传分化较大而外,可能与其生境有着密切的联系。由于此类报春花均生长在物种相对丰富、植被完好的区域,而发育成熟的生境类型有利于提高报春花的遗传多样性<sup>[8]</sup>。刘小莉等<sup>[4]</sup>利用 ISSR 标记对云南 10 种报春花亲缘关系进行分析中,也发现与本研究类似的现象。

同时雅江报春和雅砻粉报春均为粉报春组,RAPD 标记聚类结果与形态学分类的结果一致。但是灯台报春组的偏花报春与桔红灯台报春聚在类 III,而同属灯台报春组的粉被灯台报春却与脆蒴报春组的宝兴报春和青城报春聚在类 IV,这可能是高水平、稳定的基因流防止了居群间的遗传分化,使居群趋于一致<sup>[9]</sup>。从材料来源上分析,粉被灯台报春、宝兴报春、青城报春均采自于龙池国家森林公园,偏花报春、桔红灯台报春采自甘孜州。不同的生境使得物种在长期的进化演变中产生了适应各自生境的生态型,加之龙池国家森林公园保存完好,物种多样性高,使得种间基因流频繁。因此,这一地区的粉被灯台报春表现出了与宝兴报春、青城报春更近的亲缘关系。

由聚类图可以看出,不同地理来源的材料间差异明显。大部分采自龙池的材料单独聚为一类,而来自康定、理塘和木格措的材料间聚类结果并未区分地理来源。这可能是由于后三个采样点同属甘孜州,地理环境比较接近,与龙池的地理位置、气候类型存在着明显的差异,因此导致上述两个地域的报春花材料间存在明显的变异,表明不同的生态地理类型对报春花遗传结构的差异具有很大的影响作用。

偏花报春的组间定位在不同的分类系统中有所差异。Smith和 Forrest<sup>[10]</sup>将其归入钟花报春组, Richards<sup>[11]</sup>将其归入灯台报春组中;朱慧芬等<sup>[12]</sup>从染色体特征出发,认为其应归入灯台报春组。本研究聚类结果可以看出,虽然与偏花报春聚在一起的既有钟花报春组植物,也有灯台报春组植物,但在 RAPD 标记水平上偏花报春更倾向于灯台报春组。

报春花属植物的染色体基数变化较大<sup>[13-14]</sup>,由于 RAPD 技术是以基因组 DNA 为模板,因此供试材料间基因组的差异,可能会对结果产生影响。今后的研究应立足采用分子标记技术,并结合形态学特征、地理环境及气候类型等因素,更深入地探讨报春花种间的基因系统发育关系。

#### 参考文献:

- [1] Endels P, Jacquemyn H, Brys R, *et al* Temporal changes in populations of primrose in an agricultural landscape and implications for conservation[J]. *Biological Conservation*, 2002, 105: 11 - 25
- [2] Peng Nan, Suhua Shi, Shaolin Peng, *et al* Genetic Diversity in *Primula obconica* from Central and South-west China as Revealed by ISSR Marker[J]. *Annals of Botany*, 2003, 91: 329 - 333
- [3] Xue Da-Wei, GE Xue-Jun High genetic diversity in a rare, narrowly endemic Primrose species: *Primula interjacens* by ISSR analysis[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(10): 1163 - 1169
- [4] 刘小莉,刘飞虎,李宗菊. 10种报春花亲缘关系的 ISSR 分析[J]. *云南大学学报:自然科学版*, 2004, 26(5): 454 - 458
- [5] Lain W M, Vassily K, Jinhong Li, *et al* Molecular characterization of DNA sequences from the *Primula vulgaris* S-locus[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56: 1177 - 1188
- [6] 张小平,陈明林. 安徽羽叶报春与毛茛叶报春的遗传多样性研究与新资源评估[J]. *植物资源与环境学报*, 2003, 12(3): 1 - 5
- [7] Weller S G, Sakai A K, Straub C. Allozy diversity and identity in *Schiedea* and *Alsiniidendron* in the Hawaiian Islands[J]. *Evolution*, 1996, 50: 22 - 34
- [8] Jacquemyn H, Honnay O, Galbusera P. Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape[J]. *Molecular ecology*, 2004, 13: 211
- [9] 张娟,尹林克,张道远. 刚毛柞柳天然居群遗传多样性初探[J]. *云南植物研究*, 2003, 25(5): 557 - 562
- [10] Smith W W, Forrest G. The sections of the genus *Primula*[J]. *Journal of the Royal Horticultural Society*, 1928, 2: 4 - 114
- [11] Richard J. *Primula*[M]. London: B T Batsford Ltd, 1993
- [12] 朱慧芬,张长芹,顾志建. 九种报春花属植物的核形态学研究[J]. *云南植物研究*, 2001, 23(4): 466 - 472
- [13] Sakya S R, Joshi K K. Karyomorphological studies in some *Primula* species from Nepal Himalay[J]. *Cytologia*, 1990, 55: 571 - 579
- [14] 薛大伟,张长芹. 云南无量山四种报春花属植物的核型研究[J]. *云南植物研究*, 2003, 25(1): 78 - 82