

文章编号: 1000-5692(2001)01-0001-05

雷竹不同栽培类型 RAPD 分子标记的研究

方伟¹, 何祯祥², 黄坚钦¹, 史钱均¹, 林新春¹

(1. 浙江林学院 竹类研究所, 浙江 临安 311300; 2. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 对雷竹的 19 个栽培类型及 2 个近缘种进行了 RAPD 分析。从 4 组 80 个引物中筛选出 10 个引物, 产生随机扩增位点 66 个 其中多态性位点 54 个 (占 81.8%)。利用 POE GEN 32 程序进行聚类分析, 结果表明: ①聚类结果可将雷竹的不同栽培类型及其近缘种区分开来, 以前认为是雷竹一栽培型的永嘉雷竹不属于 *Ph. praecox* 种系; ②细叶雷竹与阔叶雷竹的产量高低主要取决于经营管理; ③RAPD 分子标记对竹类植物种以下等级进行分类有一定的可靠性。图 2 表 3 参 8

关键词: 雷竹; 随机扩增多态性 DNA; 分子标记; 栽培类型

中图分类号: S795.7; Q946 **文献标识码:** A

雷竹 (*Phyllostachys praecox*) 为中国特有的优良笋用竹种^[1], 主要分布于浙江西北部的丘陵平原地带, 江苏与安徽南部也有少量分布。90 年代以来, 由于雷竹出笋早、产量高、经济效益显著, 浙江省的大部分县(市), 江西、上海、江苏、安徽、福建、湖北、云南和贵州等省(市)的部分县(市)都有引种^[2]。在长期的栽培过程中, 雷竹产生了一定程度的变异, 形成了许多栽培类型。这些栽培类型该如何区分, 不同栽培类型之间的遗传变异与产量是否相关, 亟待研究。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 是 90 年代发展起来的以 PCR 为手段, 将 DNA 片段多次扩增的酶学方法^[3], 已被广泛应用于种质资源分析、品种鉴定、遗传图谱构建和基因定位等领域^[4-7]。本实验对雷竹各栽培类型及其近缘种作 RAPD 分析, 从 DNA 水平上探讨它们之间的遗传变异, 并与外部形态特征相结合, 为分类鉴定提供依据, 同时联系不同栽培类型的产量进行比较, 为雷竹丰产经营特别是品种选择提供分子证据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

材料来源见表 1, 凭证标本藏于浙江林学院竹类标本室。

1.2 雷竹总 DNA 的提取与纯化

总 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法。在 5 mL 离心管中加入 2 mL CTAB 提取液 (65 °C 预热); 取 3~4 片竹叶剪碎后用液氮加少量石英砂研磨成粉状再转入上述离心管中, 在 65 °C 下保温 5 min (期间需不时摇动); 取出离心管置于冰浴中冷却后, 166.7 s⁻¹ 离心 10 min; 取上清液至另一 5 mL 离心管, 加入等体积预冷异丙醇沉淀 DNA, 在 -20 °C 下冷冻 2 h; 166.7 s⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 倒置, 自然

收稿日期: 2000-11-27

作者简介: 方伟(1958-), 男, 浙江义乌人, 教授, 博士, 从事竹子分类与栽培研究。

干燥后加 500 μL 双蒸水溶解, 166.7 s^{-1} 离心 10 min; 将上清液移至 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 500 μL 氯仿, 166.7 s^{-1} 离心 10 min; 取上清液至新 Eppendorf 管中, 加入 1/10 体积 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积的预冷无水乙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下过夜; 166.7 s^{-1} 离心 10 min, 将沉淀物用 70% 乙醇漂洗, 再用无水乙醇过一下, 倒置气干后, 加入 100 μL TE 溶解后备用。

1.3 雷竹 RAPD 扩增反应体系及产物检测

1.3.1 反应体系 总体积 15 μL ; 模板 DNA, 3 μL (约 15 ng); 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Primer, 1.5 μL ; 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 1.5 μL ; 10 \times Buffer, 1.5 μL ; DDH₂O, 7.3 μL ; Taq 酶, 0.2 μL (1U)。

各反应管中最后加 20 μL 左右矿物油防止挥发。

1.3.2 扩增条件 雷竹 RAPD 扩增条件 (本条件适用于 15 μL 反应体系和 PE9700 扩增仪) 如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 42 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 反应进行 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min。

1.3.3 RAPD 扩增产物检测 扩增产物经 1.5% 琼脂糖胶 (含有溴化乙锭) 在 1 \times TBE 电泳缓冲液中电泳分离。电泳结束后在紫外灯下观察照相。

1.4 数据处理

RAPD 扩增带的有无分别用 “1” 和 “0” 表示, 建立数据文件。利用加拿大 Alberta 大学开发的 POPGEN 32 (for Windows 95) 进行统计分析。其中遗传距离 (genetic distance, GD) 采用 Nei's (1978) 方案进行计算。计算公式为:

$$Gd_{ij} = \{Gd_{ij}^2\} = X[1 - \frac{2X_{ij}}{2X}]$$

其中: X_{ij} 为个体 i 和 j 共有的谱带数; X 为多态性谱带数。

表 1 材料来源

Table 1 The origin of materials

| 编号 | 栽培类型名称 | 采集地点 | 采集时间 | 采集人 | 产量/($\text{t}\cdot\text{hm}^{-2}$) | 主要形态特征 |
|----|---------------------------------|--------|------------|-----|--------------------------------------|-------------|
| 1 | 细叶雷竹 (当地引种) | 绍兴梅园 | 1998-04-06 | 史钱钧 | 22.5 | 叶细, 幼秆节间白粉少 |
| 2 | 阔叶红头雷 (当地引种) | 绍兴梅园 | 1998-04-06 | 史钱钧 | 15.0 | 叶宽, 幼秆节间白粉少 |
| 3 | 阔叶青头雷 (当地引种) | 绍兴梅园 | 1998-04-06 | 史钱钧 | 12.0 | 叶厚、宽, 秆矮 |
| 4 | 安徽雷竹 (安徽引种) | 绍兴车头 | 1998-04-06 | 史钱钧 | 刚引种 | 节短隆起 |
| 5 | 细叶雷竹 (临安引种) | 绍兴县林场 | 1998-04-06 | 史钱钧 | 刚引种 | 叶细, 幼秆节间白粉少 |
| 6 | 余姚雷竹 (土名春竹) | 余姚三七市镇 | 1998-04-06 | 史钱钧 | 33.0 | 叶细, 幼秆节间白粉少 |
| 7 | 金华雷竹 (土名天雷竹) | 金华曹宅 | 1998-04-07 | 陈晓铃 | 48.3 | 叶宽, 幼秆节间白粉少 |
| 8 | 德清早园竹 | 德清武康 | 1998-04-08 | 史钱钧 | 30.0 | 叶细, 幼秆节间白粉少 |
| 9 | 弯秆雷竹 | 临安崇阳村 | 1998-04-12 | 史钱钧 | 刚引种 | 秆节间略弯曲 |
| 10 | 安徽早竹 | 安徽仙霞镇 | 1998-04-11 | 史钱钧 | 30.0 | 节短隆起 |
| 11 | 江苏燕竹 | 江苏南京 | 1998-04-14 | 史钱钧 | 无产量记载 | 叶宽, 幼秆节间白粉少 |
| 12 | 永嘉雷竹 (经营较好) | 永嘉 | 1998-04-08 | 潘美燕 | 15.0 | 叶宽, 幼秆节间白粉少 |
| 13 | 萧山早竹 (<i>Ph. propinqua</i>) | 安吉竹种园 | 1998-04-09 | 史钱钧 | 无产量记载 | 近缘种与雷竹对比 |
| 14 | 细叶早竹 | 安吉竹种园 | 1998-04-09 | 史钱钧 | 无产量记载 | 叶细, 幼秆节间白粉少 |
| 15 | 黄条早竹 | 安吉竹种园 | 1998-04-09 | 史钱钧 | 无产量记载 | 沟槽黄色 |
| 16 | 嘉兴早竹 | 安吉竹种园 | 1998-04-09 | 史钱钧 | 无产量记载 | 叶宽, 幼秆节间白粉少 |
| 17 | 早竹 | 安吉竹种园 | 1998-04-09 | 史钱钧 | 无产量记载 | 特征不详 |
| 18 | 天目早竹 (<i>Ph. tianmuensis</i>) | 安吉竹种园 | 1998-04-09 | 史钱钧 | 无产量记载 | 近缘种, 与雷竹对比 |
| 19 | 雷竹 | 安吉竹种园 | 1998-04-09 | 史钱钧 | 无产量记载 | 叶宽, 幼秆节间白粉少 |
| 20 | 花秆早竹 | 安吉竹种园 | 1998-04-09 | 史钱钧 | 无产量记载 | 节间黄绿条纹相间 |
| 21 | 永嘉雷竹 (经营较差) | 永嘉 | 1998-04-08 | 潘美燕 | 0.8 | 叶宽, 幼秆节间白粉少 |

2 结果与分析

2.1 随机引物的筛选

引物初筛在 OPB、OPC、OPP 和 OPY4 组共 80 个引物中进行, 最后确定 10 个扩增效果较好的引物

对样品 DNA 进行扩增 (引物名称序列及扩增谱带情况见表 2)。

2.2 雷竹 RAPD 扩增结果

10 个引物对雷竹 19 个栽培类型及 2 个近缘种的 DNA 均能扩增出较为清晰的谱带, 不同引物扩出的 DNA 片段长度处于 100~2 400 bp 之间。共得到随机扩增位点 66 个, 平均每个引物产生 6.6 个, 其中多态性位点 54 个, 占总位点数的 81.8%。雷竹 RAPD 扩增结果见图 1 (引物 OPC19)。

2.3 聚类分析

10 个引物对雷竹不同栽培类型及近缘种 DNA 扩增谱带经 POPGEN 32 程序统计分析, 建立遗传距离矩阵 (表 3) 及聚类系统树 (图 2)。结果表明: 雷竹不同栽培类型之间的相似性较高, 各个类型之间的遗传距离值在 0.062 5~0.552 1 之间, 大部分在 0.4 以下。据聚类图可将上述类群划分成 2 类: 第 1 类包括 1 号、6 号、5 号、8 号、20 号、9 号、14 号、15 号、17 号、16 号、7 号、2 号、4 号、10 号、19 号、11 号、3 号共 17 个雷竹栽培类型; 第 2 类包括 12 号、21 号、3 号 (萧山早竹) 和 18 号 (天目早竹)。经实地考证确认, 永嘉雷竹 (12 号和 21 号) 不属于 *Ph. praecox* 种系。表明, 由 RAPD 分子标记所得出的聚类分析图可以很好地将 *Ph. praecox* 的不同栽培类型及其近缘种区分开来。

表 2 引物序列及扩增情况

Table 2 The sequences and amplification of primers

| 引物名称 | 引物序列 | 扩增总位点数 | 多态性位点数 |
|--------|------------------|--------|--------|
| OPB-15 | 5' GGAGGTGT3' | 6 | 6 |
| OPB-20 | 5' GGACCCITAC3' | 8 | 6 |
| OPC-01 | 5' TTCGAGCCAG3' | 7 | 7 |
| OPC-06 | 5' GAACGGACTC3' | 3 | 3 |
| OPC-07 | 5' GTCCGACG C3' | 4 | 4 |
| OPC-11 | 5' AAAGCTGCGG3' | 5 | 4 |
| OPC-19 | 5' GTTGCCAGCC3' | 13 | 12 |
| OPY-17 | 5' AGAGCCGTC A3' | 4 | 4 |
| OPY-13 | 5' GGGTCTCGGT3' | 8 | 4 |
| OPY-15 | 5' AGTCGCCCTT3' | 8 | 5 |
| 总计 | 10 | 66 | 55 |

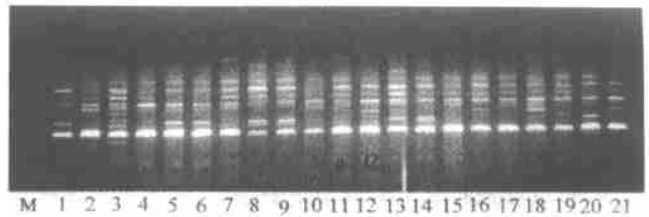


图 1 RAPD 扩增指纹图谱 (引物: OPC19)

Figure 1 RAPD amplified fingerprints (primer: OPC19)

表 3 遗传距离

Table 3 Genetic distance

| PopGD | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 2 | 0.277 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.297 8 | 0.383 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.238 4 | 0.200 7 | 0.383 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.146 6 | 0.257 8 | 0.405 5 | 0.219 4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.129 2 | 0.361 0 | 0.219 4 | 0.318 5 | 0.146 6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0.277 6 | 0.238 4 | 0.257 8 | 0.277 6 | 0.219 4 | 0.200 7 | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 0.182 3 | 0.182 3 | 0.452 0 | 0.297 8 | 0.200 7 | 0.297 8 | 0.339 5 | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 0.164 3 | 0.277 6 | 0.339 5 | 0.277 6 | 0.182 3 | 0.200 7 | 0.277 6 | 0.146 6 | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 0.277 6 | 0.277 6 | 0.476 1 | 0.238 4 | 0.257 8 | 0.361 0 | 0.361 0 | 0.297 8 | 0.164 3 | | | | | | | | | | | |
| 11 | 0.339 5 | 0.339 5 | 0.361 0 | 0.476 1 | 0.405 5 | 0.339 5 | 0.297 8 | 0.238 4 | 0.297 8 | 0.476 1 | | | | | | | | | | |
| 12 | 0.428 5 | 0.383 0 | 0.452 0 | 0.383 0 | 0.500 8 | 0.476 1 | 0.297 8 | 0.452 0 | 0.383 0 | 0.428 5 | 0.500 8 | | | | | | | | | |
| 13 | 0.297 8 | 0.257 8 | 0.405 5 | 0.428 5 | 0.361 0 | 0.383 0 | 0.383 0 | 0.238 4 | 0.297 8 | 0.476 1 | 0.361 0 | 0.361 0 | | | | | | | | |
| 14 | 0.146 6 | 0.297 8 | 0.277 6 | 0.297 8 | 0.238 4 | 0.146 6 | 0.297 8 | 0.200 7 | 0.146 6 | 0.297 8 | 0.361 0 | 0.361 0 | 0.238 4 | | | | | | | |
| 15 | 0.200 7 | 0.200 7 | 0.297 8 | 0.318 5 | 0.219 4 | 0.238 4 | 0.238 4 | 0.219 4 | 0.129 2 | 0.200 7 | 0.297 8 | 0.339 5 | 0.257 8 | 0.146 6 | | | | | | |
| 16 | 0.257 8 | 0.182 3 | 0.405 5 | 0.257 8 | 0.238 4 | 0.297 8 | 0.182 3 | 0.200 7 | 0.219 4 | 0.339 5 | 0.318 5 | 0.277 6 | 0.277 6 | 0.238 4 | 0.182 3 | | | | | |
| 17 | 0.257 8 | 0.219 4 | 0.277 6 | 0.339 5 | 0.277 6 | 0.219 4 | 0.182 3 | 0.200 7 | 0.146 6 | 0.257 8 | 0.238 4 | 0.318 5 | 0.277 6 | 0.164 3 | 0.078 8 | 0.129 2 | | | | |
| 18 | 0.361 0 | 0.277 6 | 0.428 5 | 0.452 0 | 0.383 0 | 0.361 0 | 0.318 5 | 0.257 8 | 0.277 6 | 0.405 5 | 0.297 8 | 0.297 8 | 0.219 4 | 0.339 5 | 0.277 6 | 0.257 8 | 0.219 4 | | | |
| 19 | 0.277 6 | 0.361 0 | 0.383 0 | 0.318 5 | 0.383 0 | 0.361 0 | 0.318 5 | 0.383 0 | 0.318 5 | 0.277 6 | 0.428 5 | 0.383 0 | 0.476 1 | 0.297 8 | 0.361 0 | 0.297 8 | 0.297 8 | 0.552 1 | | |
| 20 | 0.200 7 | 0.238 4 | 0.383 0 | 0.277 6 | 0.219 4 | 0.277 6 | 0.277 6 | 0.112 1 | 0.129 2 | 0.318 5 | 0.297 8 | 0.339 5 | 0.219 4 | 0.146 6 | 0.200 7 | 0.112 1 | 0.146 6 | 0.238 4 | 0.318 5 | |
| 21 | 0.383 0 | 0.383 0 | 0.361 0 | 0.383 0 | 0.500 8 | 0.383 0 | 0.257 8 | 0.405 5 | 0.339 5 | 0.476 1 | 0.452 0 | 0.062 5 | 0.277 6 | 0.277 6 | 0.297 8 | 0.238 4 | 0.238 4 | 0.297 8 | 0.339 5 | 0.297 8 |

3 讨论

3.1 聚类结果与外部形态的关系

通过聚类可知, 绍兴细叶雷竹、阔叶红头雷竹、阔叶青头雷竹、安徽雷竹、临安雷竹、余姚雷竹、金华雷竹、德清早园竹、弯秆雷竹、安徽早竹、江苏燕竹、细叶早竹、黄条早竹、嘉兴早竹、早竹、安吉雷竹和花秆早竹等都聚为一类, 说明这些不同栽培类型之间的关系较为密切。尽管黄条早竹的沟槽为黄色, 花秆早竹节间有绿黄相间之条纹而在外部形态上与雷竹原变型有明显区别, 安徽早竹和江苏燕竹等则与雷竹原变型在地理分布上有很远距离, 但聚类结果表明它们与雷竹原变型间的亲缘关系仍相当接近。江苏燕竹、安徽雷竹等很可能发源于雷竹原产地浙江的临安、德清、余杭一带。就如同丁雨龙^[8]所进行的研究一样, 比利时历史上从中国引种的 *Ph. violascens* 经 RAPD 分子标记研究, 结合形态特征认为就是浙江、江苏、安徽广为栽培的早竹(雷竹)。

绍兴的阔叶青头雷竹较为特殊, 当地农户从出笋未抽枝展叶之时即将笋头掐掉, 待到抽枝展叶时又将枝条先端部分去掉, 以便其他套种植物如豆类和蔬菜类能够较好生长, 在形态上造成秆很低矮, 叶子厚而大, 枝叶浓密, 形态上与其他类型差别很大。从聚类结果看, 与其他栽培变型的差异也相对较大, 但仍聚为一类。天目早竹幼秆翠绿无白粉, 箨舌不下延与 *Ph. praecox* 明显有别, 从聚类结果也可看出这一点。萧山早竹尽管从秆箨、节间等外部形态及出笋期等方面与雷竹很相近, 但从聚类结果看仍有较大差别, 为不同种类当无疑问。以前通常被认为是雷竹一栽培类型的永嘉雷竹与天目早竹和萧山早竹聚为一类, 经实地考证可以确认永嘉雷竹不属于 *Ph. praecox* 种系。

3.2 聚类结果与竹笋产量的关系

以前通常将雷竹划分为细叶雷竹与阔叶雷竹两大类, 并认为细叶雷竹竹笋产量较高。聚类结果表明, 这两大类雷竹内部遗传变异相关不大。结合产量调查可知(表1), 只要栽培管理良好, 阔叶雷竹也能获得高产。细叶雷竹与阔叶雷竹产量高低主要取决于经营管理, 这与历来主张只发展细叶雷竹的观点相左。

3.3 RAPD 分子标记对竹类植物种以下等级进行分类的可信度

RAPD 分子标记是一种显性标记, 难以提供完整的遗传信息, 但由于可用于 RAPD 分析的引物很多, 利用一系列引物可以使检测区域几乎覆盖整个基因组, 提高分类的可靠性。RAPD 反应的退火温度较常见 PCR 反应的退火温度要低, 反应易受环境条件的影响而导致实验的重复性差。这一缺陷可通过严格反应体系和优化反应条件来克服。在本实验中, DNA 扩增产物的重复性是比较好的, 可信度较高。从扩增结果看, 10 个引物对雷竹不同栽培类型 DNA 扩增所得到的多态性位点比较丰富, 可很好地将它们区分开来。鉴于竹类植物种以下等级从形态学上分类难度很大, 利用 RAPD 分子标记进行分类便成为一种较为有效的方法。同时还可以将 RAPD 标记与其他分类方法相结合, 使分类的可靠性进一步提高。

参考文献:

[1] 汪祖潭, 方伟. 雷竹笋用林高产经营技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993.

[2] 方伟. 刚竹属优良笋用竹引种技术[J]. 江西林业科技, 1989, (2): 44-48.

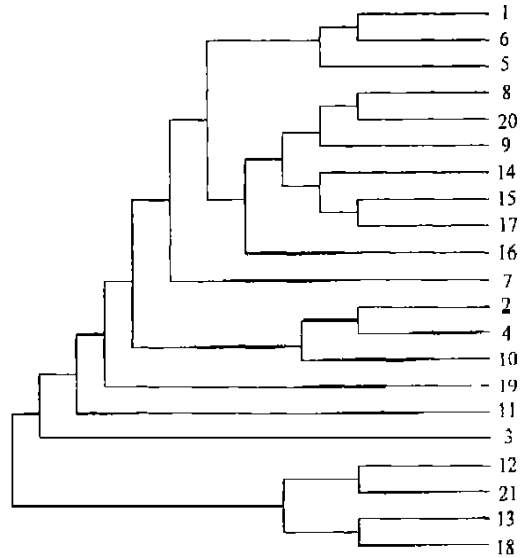


图2 RAPD 聚类树系图

Figure 2 A dendrogram of RAPD

- [3] 张杰. 一种新的遗传标记——RAPD 及其应用[J]. 世界林业研究, 1993, (3): 92—93.
- [4] 王振山, 陈洪, 朱立煌, 等. 中国普通野生稻遗传分化的 RAPD 研究[J]. 植物学报, 1996, 38(9): 749—752.
- [5] Yang X, Quiros C F. Identification and classification of Celeryof cultivars with RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 205—212.
- [6] Stiles J I. Using amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among Papaya cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 697—701.
- [7] Penner G A. Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene Pg3 [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 702—705.
- [8] 丁雨龙. 刚竹属 *Phyllostachys* 系统分类的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 1998.

Studies on cultivars of *Phyllostachys praecox* with RAPD molecular markers

FANG Wei¹, HE Zheng-xiang², HUANG Jian-qin¹, SHI Qian-jun¹, LIN Xin-chun¹

(1. Bamboo Research Institute, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjiang Forestry University, Nanjiang 210037, Jiangsu, China)

Abstract: With RAPD molecular markers, 19 cultivars and 2 affinis species of *Phyllostachys praecox* were analysed. Using 10 primers screened from 80 primers, 66 loci were amplified, and 54 of these were polymorphic (81.8%). The UPGMA cluster analysis of POPGEN 32 program showed: (1) The cultivars and affinis species of *Ph. praecox* can be divided by UPGMA analysis, and the Yongjia Lei Bamboo recognized as one of the cultivars of Lei Bamboo before doesn't belong to *Ph. praecox*. (2) The production of narrow-leaved Lei Bamboo and broad-leaved Lei Bamboo mainly decided by management. (3) The classification on bamboo under species based on RAPD markers is somewhat reliable.

Key words: *Phyllostachys praecox*; random amplified polymorphic DNA; molecular markers; cultivars