

金花茶与近缘种的 RAPD 分析及分类学意义^{*}

唐绍清 施苏华 陈月琴 屈良鹄 张宏达

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术分析了金花茶、防城金花茶、小果金花茶、多瓣金花茶、毛瓣金花茶、东兴金花茶、平果金花茶和顶生金花茶等 6 种 2 变种金花茶植物。用 14 个引物 (10 bp) 扩增出 173 个 DNA 片段, 这些遗传标记用来计算种间遗传相似性系数, 进行聚类分析, 并构建了树状分枝图。分析结果表明, 防城金花茶与金花茶的关系很近, 应将防城金花茶归并到金花茶; 小果金花茶、多瓣金花茶与金花茶彼此间的关系较近; 东兴金花茶、平果金花茶、顶生金花茶、毛瓣金花茶和金花茶彼此间的关系较远, 支持这几个种成立的观点。

关键词 金花茶植物, RAPD, 遗传相似性

分类号 Q 949.758.4

金花茶植物是以金花茶 (*Camellia nitidissima* Chi) 为代表的, 具黄色花的山茶属植物, 有重要的观赏价值, 是珍贵而著名的种质资源。关于金花茶植物的形态解剖、核型和花粉形态等各个方面已有较多的研究^[1-3], 但对金花茶植物各个种之间系统关系和分类处理仍存在着较大争议^[4-7]。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析具有成本低、分析速度快、仅需要极微量的 DNA 即能获得丰富的多态性特征等优点, 已被广泛应用于研究属下分类单位的分类和进化等方面的研究^[8]。本文采用 RAPD 分析方法研究了金花茶、防城金花茶 (*C. nitidissima* var. *phaeopubisperma* S Y Liang et Z H Tang)、小果金花茶 (*C. nitidissima* var. *microcarpa* (M o et Huang) Chang et Ye)、多瓣金花茶 (*C. multipetala* S Y Liang et C D Deng)、毛瓣金花茶 (*C. pubipetala* Y Wan et S Z Huang)、东兴金花茶 (*C. tunghinensis* Chang)、平果金花茶 (*C. pingguoensis* D Fan) 和顶生金花茶 (*C. terminalis* J Y Liang et Z M Su), 其中多瓣金花茶是以裸名发表的种。本研究的目的在于为解决金花茶植物的分类问题提供新的分子证据, 同时为金花茶植物种质资源的保护和利用提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

金花茶 6 个种及 2 个变种的材料来源见表 1, 凭证标本藏于中山大学植物标本室。

^{*} 广东省自然科学基金 (950092) 资助项目

收稿日期: 1998-02-26 唐绍清, 男, 34 岁, 讲师, 现在广西师范大学生物学系工作

1.2 方 法

1.2.1 植物 DNA 提取 取所采集的同种金花茶植物各株的叶子, 各剪取一部分混合用于 DNA 提取. 采用 CTAB 法^[9]提取总 DNA. DNA 纯化按以下步骤进行: DNA TE 溶液加入 1% 体积的 RNA 酶 (10 mg/mL), 37℃ 保温 45 min; 加入 3 倍体积的 6 mol/L NaCl, 约 4 μL 玻璃粉 TE 溶液, 混匀, 放置 5 min (中间摇动几次); 5 000 r/min 离心 3 min, 去上清液; 加洗液 (含 0.2 mol/L NaCl; 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA; d = 50% 的乙醇) 150 μL, 混匀, 4 000 r/min 离心 1 min, 去上清液, 重复清洗 3 次; 晾干, 加 50 μL K TE; 50℃ 保温 20 min; 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液移至新管, 弃沉淀, -20℃ 保存, 用于 PCR.

表 1 用于本研究的材料 来源和凭证号 (唐绍清)

Tab. 1 Taxa, sources and voucher nos (Tang Shaoqing) of the *Camellia* plant material used in this study

编号	材料	来源 ¹⁾	采集株数	凭证号
1	<i>C. nitidissima</i>	D	5	95027
2	<i>C. nitidissima</i> var. <i>phaeopubisperma</i>	B	10	95013
3	<i>C. nitidissima</i> var. <i>microcarpa</i>	A, C	2	95021, 95023
4	<i>C. multipetala</i>	B	2	95018
5	<i>C. pubipetala</i>	A, C	2	95024, 95034
6	<i>C. tungchinensis</i>	B	10	95016
7	<i>C. pingguoensis</i>	A	3	95008
8	<i>C. terminalis</i>	A, C	5	95009

1) A 南宁树木园; B 南宁新竹苗圃; C 广西植物研究所; D 中山大学茶园

1.2.2 DNA 扩增 扩增条件如下: 每 15 μL 反应体积含 K Tag 酶 buffer (华美生物工程公司); 约 10~15 ng 总 DNA; 2.0 mmol/L MgCl₂; 100 μmol/L 的各 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (华美生物工程公司); Tag 酶 1 个单位 (A 组 C 组引物用华美生物工程公司产品, B 组 G 组引物用 Promega 公司), 1/10 反应体积的引物 (Operon 公司产品). 对照样品加除总 DNA 以外的以上各成分, 用双蒸水代替总 DNA.

在 PCR 仪 (Perkins-Elmer Cetus model 480) 上按下列程序进行扩增: 94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 1 min 35℃ 1 min 72℃ 2 min, 45 个循环; 72℃ 7 min, 1 个循环.

PCR 结果检测: 取 10 μL 样于 1.4% 琼脂糖凝胶, K TAE 缓冲溶液中电泳, 稳压 (4 V/cm) 电泳约 4 h 30 min, 1 000 bp Ladder DNA (美, 生命技术公司产品) 用作 M 标准; 凝胶在 0.5 μg/mL 溴化乙锭溶液中染色约 40 min, 紫外光下检测, 照相.

PCR 扩增反应均重复 1 次, 有扩增产物 DNA 带者记作 1, 缺乏记作 0, 选取长度在 200~2 200 bp 可重复的 DNA 带 (包括强带和弱带) 记录待分析. 采用 Jaccard^[10] 相似系数计算种间遗传相似程度, 用 UPGMA 法^[11] 对各个种间的相似性系数进行聚类分析. 用 Basic 语言编写的程序^[12] 进行计算.

2 结果与分析

(1) 随机扩增引物的筛选: 对 7 组共 140 个随机引物 (10 个核苷酸长) 进行筛选. 仅选用能得到清晰扩增带、对照无假带、扩增假带弱、加总 DNA 后这些假带消失的引物, 共 14

个 (表 2) 进行正式的扩增. 但防城金花茶缺引物 OPB-08和 OPB-172个引物.

表 2 用于本研究的引物及其序列

Tab. 2 The primers used in this study and their sequences

引物	序列 (5' -3')	引物	序列 (5' -3')	引物	序列 (5' -3')
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPC-04	CCGCATCTAC	OPA-11	CAATCGCCGT
OPC-08	TGGACCGGTG	OPA-13	CAGCACCCAC	OPC-11	AAAGCTGCGG
OPA-14	TCTGTGCTGG	OPG-03	GAGCCCTCCA	OPA-15	TTCCGAACCC
OPG-05	CTGAGACGGA	OPB-08	GTCCACACGG	OPG-06	GTGCCTAACC
OPB-17	AGGGAACGAG	OPG-11	TGCCCGTCGT		

(2) PCR扩增结果与相似性系数分析: 采用 14个引物对 8个分类群的总 DNA进行扩增, 共得到 173条可区分的 DNA带, 最少的在引物 OPA-13只获得了 2条带, 最多的在引物 OPA-01得到了 21条带, 平均每个引物产生了 12.3条带, 其中引物 OPC-11和 OPG-06的扩增结果见图 1. 每一 DNA片段被看作一个可区分的分子标记, 用于计算各分类群间的相似程度, 结果见表 3.

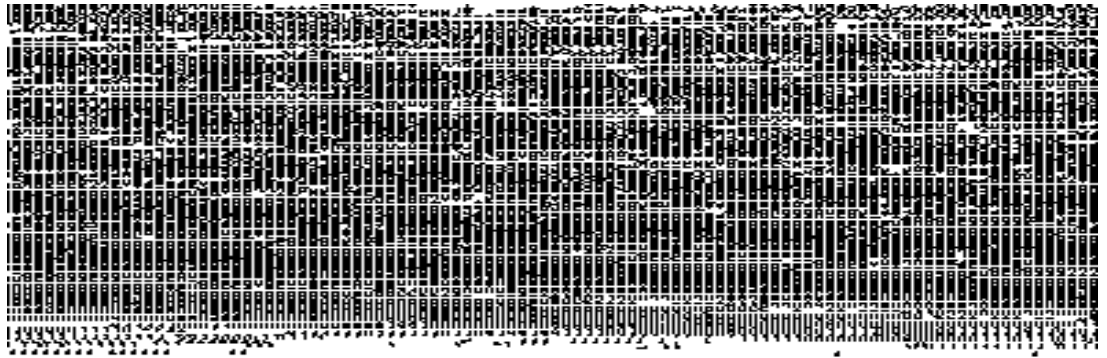


图 1 由引物 OPC-11 (a) 和引物 OPG-06 (b) 扩增产生的 RAPD带型

Fig. 1 RAPD profiles generated by primer OPC-11 (a) and OPG-06 (b)

M 1 000 bp ladder DN A Marker

表 3 8 个分类群间的 Jaccard相似性系数

Tab. 3 The Jaccard coefficient of similarity among the 8 taxa

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1							
2	0.796	1						
3	0.425	0.424	1					
4	0.366	0.380	0.44	1				
5	0.25	0.234	0.337	0.22	1			
6	0.402	0.368	0.261	0.28	0.258	1		
7	0.284	0.311	0.316	0.333	0.26	0.244	1	
8	0.359	0.372	0.327	0.356	0.286	0.291	0.318	1

根据这些种间 Jaccard 相似性系数, 采用 UPGMA 法进行聚类分析, 得到一树状分枝图 (图 2).

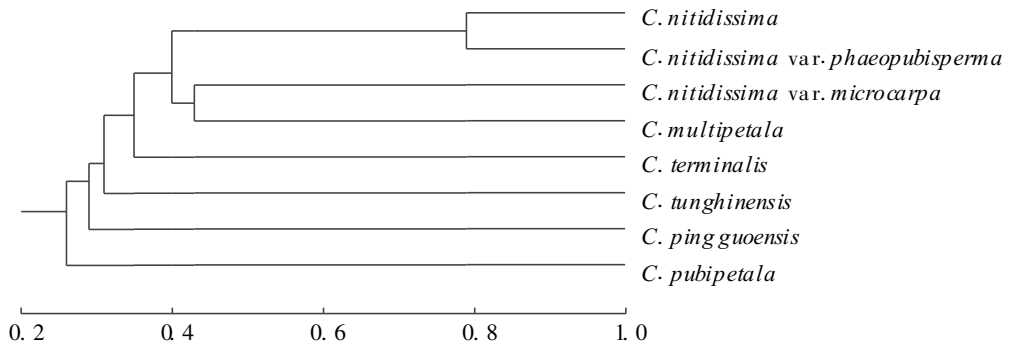


图 2 用 Jaccard 相似性系数分析产生的树状分枝图 (UPGMA 法)

Fig. 2 Dendrogram generated by using Jaccard's coefficient of similarity (UPGMA)

3 讨 论

对于防城金花茶, 除其发表者梁盛业外, 其他学者认为应归并入金花茶^[4,6]或小果金花茶^[5], 本研究所获得的 RAPD 分析结果表明, 金花茶与防城金花茶间的相似性系数高达 0.798 (见表 3), 从 Jaccard 相似性系数聚类分析树图也可以看出 (图 2) 两者明显为同一种植物, 支持将防城金花茶归入金花茶的观点, Hao 等从花粉形态也得出了同样的结论的^[3]. 以裸名发表的多瓣金花茶, 被一致认为是不成立的, 张宏达认为应归并到金花茶, 闵天禄认为应归并到小果金花茶, 而叶创兴等认为应归并到广西五室金花茶 (*C. quinqueliculosa* S. Y. Liang et Y. C. Zhong), 本分析结果表明小果金花茶与多瓣金花茶间的相似性系数相对较大, 将其归并到小果金花茶较为合理. 但多瓣金花茶与小果金花茶间的相似性系数较其与金花茶间的相似性系数差异不大.

毛瓣金花茶和平果金花茶被一致认为成立的; 叶创兴和梁盛业承认东兴金花茶, 闵天禄认为东兴金花茶是中越山茶 (*C. indochinensis* Merr) 的变种; 对于顶生金花茶, 叶创兴承认此种, 而闵天禄和梁盛业认为它是平果金花茶的变种. 本分析结果表明这 4 个种彼此间及与金花茶的相似性系数都较小, 支持这 4 个种成立的的观点.

毛瓣金花茶在形态上与其他各个种差异最大, 甚至被认为与其他金花茶植物不属同一组^[5]. 本分析结果表明, 毛瓣金花茶与其他各个种的遗传相似性都较低, 这与从形态学得出的结论是一致的.

参 考 文 献

- 1 梁盛业, 蒋承曾, 徐峰, 等. 金花茶. 北京: 中国林业出版社, 1993
- 2 张文驹, 闵天禄. 山茶属古茶组植物的细胞学研究. 云南植物研究, 1995, 17 (1): 48-54
- 3 Hao H P, Zhang J T, Liang S Y. Pollen morphology of the Ser. *Chrysantha* (Theaceae *Camellia*) and its implications on taxonomy. Chinese Journal of Botany, 1993, 5 (2): 130-137
- 4 叶创兴, 许兆然. 关于金花茶组的研究. 中山大学学报 (自然科学版), 1992, 31 (4): 68-77

- 5 闵天禄, 张文驹. 山茶属古茶组的分类学问题. 云南植物研究, 1993, 15 (1): 1~ 15
- 6 张宏达. 山茶科的系统发育论析. 中山大学学报 (自然科学版), 1996, 35 (1): 77~ 83
- 7 梁盛业. 广西金花茶植物的初步研究. 广西林业科技, 1990, (1): 1~ 42
- 8 Demeke T, Adams R P. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. PCR Technology: Current Innovations CRC Press, 1994. 179~ 191
- 9 Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19 1~ 15
- 10 Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat, 1908, 44 223
- 11 Sneath P H A, Sokal R R. Numerical taxonomy. San Francisco W H Freeman and Company, 1973
- 12 钟扬, 陈家宽, 黄德世. 数量分类的方法与程序. 武汉: 武汉大学出版社, 1990. 22~ 233

Phylogenetic Relationship of *Camellia nitidissima* Chi and Its Allied Species Based on Random Amplified Polymorphic DNA

Tang Shaoqing* Shi Suhua Chen Yueqin
Qu Lianghu Zhang Hongda (Chang Hungta)

Abstract Six species and two varieties of yellow *Camellia* were analyzed, using random amplified polymorphic DNA (RAPD) genetic markers. Fourteen decanucleotide primers were used for DNA amplification, 173 markers generating. The genetic marker data were analyzed using Jaccard's similarity coefficients. A dendrogram was constructed by using UPGMA method. The results are in agreement with the views of that *C. nitidissima* has a very close relationship with *C. nitidissima* var. *phaeopubisperma*. It also indicates that *C. nitidissima*, *C. nitidissima* var. *microcarpa* and *C. mutipetala* have a close relationship between each other. *C. nitidissima*, *C. tunghinensis*, *C. pingguoensis*, *C. terminalis* and *C. pubipetala* have a distant relationship between each other.

Keywords Yellow *Camellia* species, RAPD, genetic similarities

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 5102750, China