

基于 SRAP 分析苧麻及近缘种的系统学关系

廖亮^{1,2}, 李同建¹, 赵中伟^{1,2}, 陈玉波¹,
徐玲玲^{1*}, 潘其辉³, 石庆华^{2*}

(1. 江西九江学院 生命科学学院, 江西 九江 332000; 2. 江西农业大学 农学院,
南昌 330045; 3. 江西省麻类科学研究所, 江西 宜春 336000)

摘要: 苧麻与近缘种的系统学关系一直存在争议。利用 26 对多态性好的随机引物, 对中国苧麻属的 17 种 9 变种的共 27 份材料进行 SRAP 分子标记分析。扩增结果是 26 对引物共扩出 368 条带, 其中 363 条为多态性带, 占 98.64%。聚类分析表明: (1) 腋球苧麻组的腋球苧麻和苧麻组的苧麻、贴毛苧麻聚在一支并靠近系统树的根部, 支持王文采苧麻组起源于原始的腋球苧麻组观点。(2) 苧麻和贴毛苧麻聚在一支, 支持郭安平苧麻直接起源于贴毛苧麻的观点。(3) 苧麻组的青叶苧麻、微绿苧麻和大叶苧麻组的多倍体类群聚在一支, 可能是由于在种间杂交导致。

关键词: 中国苧麻属; SRAP; 系统学关系

中图分类号: Q949.737.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)06-0791-05

Phylogenetic relationship of ramie and its wild relatives based on SRAP markers

LIAO Liang^{1,2}, LI Tong-Jian¹, ZHAO Zhong-Wei¹, CHEN Yu-Bo¹,
XU Ling-Ling^{1*}, PAN Qi-Hui³, SHI Qing-Hua^{2*}

(1. College of Life Science, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China; 2. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3. Jiangxi Institute of Bast Fiber Crops, Yichun 336000, China)

Abstract: It was considered that there was disputation on the systematics of the genus *Boehmeria*, as well as the relationship among different sections in this genus. The phylogenetic relationship of 17 species and 9 varieties of *Boehmeria* was investigated using SRAP analysis based on a total of 27 samples. 368 bands were produced by SRAP technique using 26 primer pairs, of which 363 (98.64%) bands were polymorphic. It was also indicated by clustering analysis that: (1) *Boehmeria malabarica* var. *malabarica* (sect. *Boehmeria*), *B. nivea* (sect. *Tilocnide*) and *B. nivea* var. *nipononivea* (sect. *Tilocnide*) were clustered into one branch and near the root of the phylogenetic tree, indicating that sect. *Tilocnide* originated from sect. *Boehmeria*; (2) *B. nivea* and *B. nivea* var. *nipononivea* were clustered into one branch, indicating that *B. nivea* originated directly from *B. nivea* var. *nipononivea*; (3) *B. nivea* var. *viridula* (sect. *Tilocnide*) and *B. nivea* var. *tenacissima* (sect. *Tilocnide*) were clustered together with the polyploid of sect. *Duretia*, which might have resulted from interspecific hybridization.

Key words: *Boehmeria*; SRAP; phylogenetic relationship

收稿日期: 200-04-02 修回日期: 2010-01-22

基金项目: 江西自然科学基金(2008G2N0044); 江西省教育厅科技项目(GJJ08431); 国家自然科学基金(31060050)[Supported by Natural Science Foundation of Jiangxi(2008G2N0044); Sci-Tech Program of Jiangxi Provincial Education Department(GJJ08431); National Natural Science Foundation of China(31060050)]

作者简介: 廖亮(1958-), 男, 江西丰城人, 博士, 从事植物系统与进化研究, (E-mail) LiaoL58@yahoo.com.cn.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: shiqh@public.nc.jx.cn, LingL239@163.com)

苎麻属 *Boehmeria* (Urticaceae) 全世界约有 120 种, 主要分布在热带、亚热带, 少数在温带, 其中亚洲约有 75 种, 美洲有 30 种, 大洋洲和非洲有少数种。中国有 31 种 12 变种(王文采, 1981a, 1981b, 1995)。中国苎麻属是世界苎麻属的重要部分, 其中有很多具有重要经济价值的物种, 苎麻是中国及东亚地区的主要的纤维作物, 青叶苎麻在南亚地区被广泛的栽培利用, 悬铃木叶苎麻等可做药用。

苎麻属自 Jacquin 1760 年根据美洲的 *Boehmeria ramiflora* 建立以来, 有多位学者对该属进行过研究, Blume (1856) 在其荨麻科专著中记载了苎麻属 74 种植物, 并根据叶、花序、子房等性状将这 74 种植物分为 6 群; 1869 年 Weddell 根据团伞花序腋生或组成穗状或圆锥状花序, 以及叶互生或对生的性状对苎麻属 47 种植物进行分类整理; Satake (1936) 记载了日本及近邻的苎麻属 39 种植物, 将苎麻属分成 2 个亚属、8 个组; 王文采 (1981a, 1981b, 1995) 根据叶序、花序、雄花、瘦果等外部形态将中国苎麻属植物整理为 32 种 11 变种, 并隶属五个组: 1. 腋球苎麻组; 2. 苎麻组; 3. 帚序苎麻组; 4. 序叶苎麻组; 5. 大叶苎麻组。提出苎麻属各组是以腋球苎麻组为原始中心类群, 辐射进化的结果, 即苎麻组直接来源于腋球苎麻组; 张波等 (1998) 对中国苎麻属 5 组 13 种的形态学和 4 组 10 种的孢粉学进行比较, 提出苎麻属各组是以腋球苎麻组为原始类群单线进化至大叶苎麻组再分成苎麻组和序叶苎麻组两个分支, 即苎麻组来源于大叶苎麻组, 与王文采观点不同, 并认为苎麻起源于青叶苎麻。郭安平 (1999) 利用 RAPD 分子标记, 对苎麻属进行了基因组指纹图谱构建, 将 15 个种分成 5 大类, 它们分别对应了根据形态学特征分成的 5 个组群, 支持了王文采的分组观点, 并提出苎麻组演化关系为: 微绿苎麻→青叶苎麻→贴毛苎麻→苎麻, 与张波观点不一致。蒋彦波 (2005) 利用筛选得到的 31 对苎麻微卫星引物研究了苎麻组亲缘关系, 其观点与张波的相似。由此可见不同学者对苎麻与其近缘种的关系及苎麻变种间的关系都是存在争议的。

自 2001 年序列相关扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 技术出现以来 (Li & Quiros, 2001), SRAP 标记已在多种植物研究中得到成功应用, 广泛用于基因定位、基因克隆、遗传图谱构建及植物系统学等生物学研究 (柳李旺等, 2004; 高丽霞等, 2008a, b)。本文利用 SRAP

分子标记技术, 对中国苎麻属 17 种 9 变种共 27 份材料进行聚类分析, 试图从分子标记的角度来探讨苎麻与其近缘种及苎麻变种间的关系, 为更好地开发和保护苎麻属植物资源打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

材料来源及凭证标本号见表 1, 凭证标本存放于九江学院植物标本馆 (JJT), 部分材料采自江西省苎麻研究所野生苎麻种质资源圃。取幼嫩芽尖硅胶干燥, -80°C 保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法 (Doyle JJ & Doyle JL, 1987) 提取总 DNA。

1.2.2 SRAP 分析方法 SRAP 引物采用 Li 和 Quiros (2001) 发表的引物序列, 包括 10 条正向引物和 10 条反向引物 (表 2), 委托上海生工生物工程有限公司合成。正反引物共组成 100 对引物组合, 利用 4 个种进行引物筛选。PCR 反应程序采用 Li 和 Quiros (2001) 应用于蔬菜上的反应程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 35°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 5 个循环; 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。扩增产物用 0.6% 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳检测, 银染显影, 拍照记录条带。

1.2.3 数据分析方法 聚类分析利用 NTSYS 2.10e 软件, 采用 Jaccard 相似性系数, 非加权组平均法 (UPGMA) 聚类 (Sneath & Sokal, 1973)。多态性片段的有无分别用“1”和“0”表示, 至少同时存在于两份材料内的多态性片段为有效。

2 结果

在 100 对 SRAP 引物组合中, 筛选出 26 对条带清晰、重复性好的引物组合作为苎麻属 SRAP 分子标记的引物, 共扩增出 368 条谱带, 其中 363 条为多态性条带, 多态性比例为 98.64%, 平均每对引物扩增出 13.96 条带。多态性条带最多的引物组合为 Me3+Em4 和 Me3+Em7, 达到 22 条。表 3 列出了所选引物组合及其扩增出的多态条带数。

遗传相似性系数表明, 供试材料的遗传相似性系数变化范围在 0.08~0.51 之间, 说明供试材料遗

传变异很大。其中,相似性系数最低的为腋球苧麻 苧麻,达到 0.51(表 1 和图 1)。与青叶苧麻,仅为 0.08;最高的为大叶苧麻与密球 本实验的聚类分析结果如图 1 所示。27 份材

表 1 材料来源
Table 1 Origin of materials

组名 Sect	种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher
腋球苧麻组 sect. <i>Boehmeria</i> (a)	腋球苧麻 <i>Boehmeria malabarica</i> var. <i>malabarica</i>	云南勐仑	Li00121
	光枝苧麻 <i>B. malabarica</i> var. <i>leioclada</i>	云南勐仑	Li002
苧麻组 sect. <i>Tilocnide</i> (b)	苧麻 <i>B. nivea</i>	安徽青阳	Li0045
	贴毛苧麻 <i>B. nivea</i> var. <i>nipponnivea</i>	广西桂林	Li0073
	微绿苧麻 <i>B. nivea</i> var. <i>viridula</i>	广西都安	Li0052
	青叶苧麻 <i>B. nivea</i> var. <i>tenacissima</i>	浙江杭州	Li0062
帚序苧麻组 sect. <i>Zollingeriana</i> (c)	帚序苧麻 <i>B. zollingeriana</i>	云南景洪	Li008
	黔桂苧麻 1 <i>B. blinii</i> var. <i>blinli</i> 1	贵州贵阳	Li0010
	黔桂苧麻 2 <i>B. blinii</i> var. <i>blinli</i> 2	贵州贵阳	Li009
序叶苧麻组 sect. <i>Phyllostachys</i> (d)	白面苧麻 <i>B. clidemioides</i> var. <i>clidemioides</i>	重庆巫山	Li00101
	序叶苧麻 <i>B. clidemioides</i> var. <i>diffusa</i>	四川达县	Li00112
	滇黔苧麻 <i>B. pseudotricuspis</i>	贵州贵阳	Li0012
大叶苧麻组 sect. <i>Duretia</i> (e)	灰绿水苧麻 <i>B. macrophylla</i> var. <i>canescens</i>	云南孟腊	Li0014
	圆叶水苧麻 <i>B. macrophylla</i> var. <i>rotundifolia</i>	云南孟腊	Li0015
	糙叶水苧麻 <i>B. macrophylla</i> var. <i>scabrella</i>	云南昭通	Li0016
	疏毛水苧麻 <i>B. pilosiuscula</i>	广西都安	Li0017
	海岛苧麻 <i>B. formosana</i> var. <i>formosana</i>	海南五指山	Li0018
	福州苧麻 <i>B. formosana</i> var. <i>fuzhouensis</i>	云南孟腊	Li0019
	伏毛苧麻 <i>B. strigosa</i> var. <i>strigosa</i>	云南孟腊	Li0020
	柔毛苧麻 <i>B. strigosa</i> var. <i>mollis</i>	福建永定	Li0021
	长叶苧麻 <i>B. penduliflora</i>	广西柳州	Li0023
	大叶苧麻 <i>B. longispica</i>	云南孟腊	Li00224
	密球苧麻 <i>B. densiglomerata</i>	江西崇义	Li0024
	细野麻 <i>B. gracilis</i>	贵州贵阳	Li0025
	赤麻 <i>B. silvestrii</i>	江西崇义	Li0026
	束序苧麻 <i>B. siamensis</i>	云南孟腊	Li0028
长序苧麻 <i>B. dolichostachya</i>	云南孟腊	Li0031	

表 2 SRAP 引物序列
Table 2 Primer sequences used for SRAP analysis

编号 Code	正向引物 Forward primers	编号 Code	反向引物 Reverse primers
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCT
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em8	GACTGCGTACGAATTAGC
Me9	TGAGTCCAAACCGGACA	Em9	GACTGCGTACGAATTACG
Me10	TGAGTCCAAACCGGACG	Em10	GACTGCGTACGAATTTAG

料聚为 5 个类群。第 I 群:腋球苧麻组的光枝苧麻,其叶互生,团伞花序单生叶腋;雄蕊四基数,近无梗;瘦果有柄,无翅;为苧麻属中原始类群。第 II 群:腋球苧麻组的腋球苧麻和苧麻组的苧麻、贴毛苧麻。第 III 群:大叶苧麻组的糙叶水苧麻和福州苧麻。

第 IV 群:苧麻组的青叶苧麻、微绿苧麻和大叶苧麻组的赤麻、大叶苧麻、密球苧麻、海岛苧麻和柔毛苧麻,赤麻、大叶苧麻、密球苧麻、海岛苧麻均为多倍体。第 V 群:帚序苧麻组、序叶苧麻组和大叶苧麻组的类群相互交错在一起。

3 讨论

3.1 苎麻组和腋球苎麻组的关系

在形态上,腋球苎麻组团伞花序单生,雄蕊四基数,被认为是苎麻属最原始的类群;而苎麻组由团伞花序为基本单位进一步构成圆锥花序,雄蕊四基数,王文采(1981a,b,1995)认为苎麻组起源于腋球苎麻组,但张波等(1998)认为苎麻组起源于大叶苎麻组。从以遗传距离聚类的系统树看(图1),腋球苎麻组的光枝苎麻单独在根部分出一支,显示出其原始性,并且腋球苎麻组的腋球苎麻和苎麻组的苎麻、贴毛苎麻聚在一支靠近根部,说明两个组有密切的亲缘关系,SRAP分子标记分析的结果支持王文采的观点。

表3 所选引物组合及其产生的多态性条带
Table 3 Primer pairs chosen and the number of polymorphic bands generated by them

引物组合编号 Primer pair serial number	引物组合 Name of primer pair	多态条带数 Number of polymorphic bands
1	Me1 + Em1	12
2	Me1 + Em7	15
3	Me1 + Em9	15
4	Me2 + Em1	8
5	Me2 + Em4	14
6	Me2 + Em5	6
7	Me2 + Em9	9
8	Me3 + Em3	9
9	Me3 + Em4	22
10	Me3 + Em5	2
11	Me3 + Em7	22
12	Me4 + Em9	9
13	Me5 + Em4	15
14	Me5 + Em7	12
15	Me5 + Em9	15
16	Me6 + Em4	16
17	Me6 + Em6	19
18	Me6 + Em7	19
19	Me6 + Em9	21
20	Me7 + Em8	15
21	Me8 + Em7	18
22	Me8 + Em9	17
23	Me9 + Em6	18
24	Me9 + Em9	12
25	Me10 + Em4	21
26	Me10 + Em6	2

3.2 苎麻组苎麻变种间的关系

王文采将苎麻组分为一种三变种,苎麻、贴毛苎麻、微绿苎麻、青叶苎麻;而陈家瑞(2003)将苎麻分为

两变种,一种为苎麻,其他三变种归并为青叶苎麻。张波(1998)认为苎麻来源于青叶苎麻,而郭安平(1999)则认为苎麻起源于贴毛苎麻。从本文实验结果看,四个变种有不同的SRAP分子标记特征,在基于遗传距离建立的系统树看(图1),苎麻和贴毛苎麻聚在一支,而青叶苎麻和微绿苎麻聚在一支,显示贴毛苎麻和苎麻的关系更为密切,SRAP分子标记分析的结果支持郭安平的观点。从苎麻组一种三变种SRAP分子标记的谱带特征看,苎麻、贴毛苎麻、青叶苎麻和微绿苎麻SRAP分子标记的谱带各有自身特征,实验结果支持王文采苎麻一种三变种的观点。

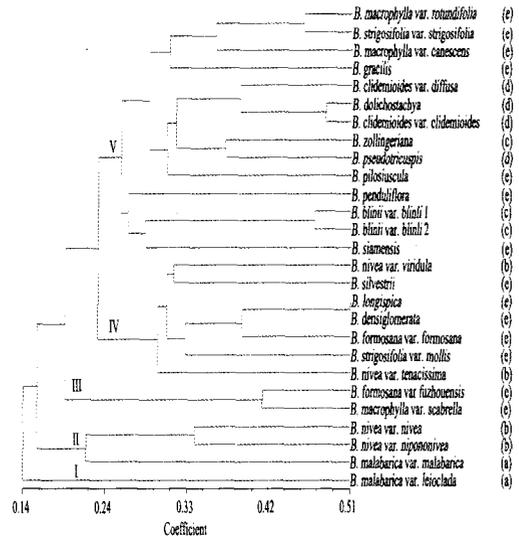


图1 中国苎麻属26个类群SRAP聚类图
Fig. 1 Dendrogram of 26 taxa of *Boehmeria* in China based on SRAPs

3.3 苎麻组和大叶苎麻组的关系

张波(1998)从形态学的角度出发,认为苎麻组起源于大叶苎麻组,从基于遗传距离建立的系统树来看(图1)苎麻组的青叶苎麻、微绿苎麻和大叶苎麻组的多倍体类群,如赤麻(3x)、大叶苎麻(3x)、海岛苎麻(3x)聚在一支(图1),显示青叶苎麻、微绿苎麻和大叶苎麻组确有密切联系。然而,在形态上,苎麻组叶互生,雄蕊四个,瘦果无翅。大叶苎麻组开始出现有叶轮生、雄蕊三个和瘦果具翅的相对更特化的性状。从染色体数目上来看,在中国苎麻属已报道的7个多倍体毫不例外都来自大叶苎麻组

(IPCN, 2009), 其他 4 组均为二倍体, 说明大叶苧麻组是 5 个组中最为进化的一个组, 但难以想象青叶苧麻和微绿苧麻可能来源于进化程度高的大叶苧麻组多倍体种。另外, 也有证据(廖亮, 2009)可以说明苧麻组和较原始的腋球苧麻组接近。本实验结果显示苧麻组的青叶苧麻、微绿苧麻和大叶苧麻组的多倍体类群聚为一支, 造成这种现象的原因可能是种间杂交或基因渐渗所致, 在 ITS 序列克隆分析中也表明苧麻存在组间杂交(廖亮, 2009), 即苧麻组和大叶苧麻组的紧密关系可能是组间杂交或基因渐渗所致。

参考文献:

- 王文采. 1995. 苧麻属[M]//中国植物志. 北京: 科学出版社, 23(2): 187—312
- 陈家瑞, Friis I. 2003. 苧麻属[A]. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 5: 164—174
- Blume CL. 1856. Museum[M]. Bot Lugd, 2: 194—227
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bull, 19: 11—15
- Gao LX(高丽霞), Liu N(刘念), Huang BH(黄邦海), et al. 2008a. Optimization and formation SRAP system in *Hedychium* (姜花属 SRAP-PCR 体系的优化与建立)[J]. *Guihaia*(广西植物), 28(5): 604—607
- Gao LX(高丽霞), Hu X(胡秀), Liu N(刘念), et al. 2008b. Cluster analysis of Chinese *Hedychium* based on SRAP markers (中国姜花属基于 SRAP 分子标记的聚类分析)[J]. *J Syst Evol*(植物分类学报), 46(6): 899—905
- Guo AP(郭安平). 1999. Phylogeny of genus *Boehmeria* reconstructed by RAPD fingerprinting(RAPD 分子标记重建我国苧麻属植物亲缘关系的研究)[D]. 长沙: 湖南农业大学 IPCN; <http://mobot.mobot.org/w37/search/ipcn.html>
- Li G, Quiros CF. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. *Theor Appl Genet*, 103: 455—461
- Liao L(廖亮), Li TJ(李同建), Liu ZL(刘中来), et al. 2009. Phylogenetic relationship of ramie and its wild relatives based on cytogenetics and DNA sequences(基于细胞学和 DNA 序列的苧麻与其野生近缘种类群系统关系研究)[J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), 35(10): 1778—1790
- Liu LW(柳李旺), Gong YQ(龚义勤), Huang H(黄浩), et al. 2004. Novel molecular marker systems-SRAP and TRAP and their application(新型分子标记 SRAP 与 TRAP 及其应用)[J]. *Hereditas*(遗传) 26(5): 777—781
- Jiang YB(蒋彦波). 2005. Isolation and characterization of microsatellites from ramie(*Boehmeria nivea*) and its application for analysis of genetic relationships in sect. *Tillocnide*(苧麻微卫星的分离与鉴定及其在苧麻组亲缘关系研究中的应用)[D]. 中国农业科学院
- Satake Y. 1936. *Boehmeria japonica* Journ. Fac. Sci. Univ. Tokyo. Sect. III, 4: 467—542
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification[M]. San Francisco: Freeman
- Wang WC(王文采). 1981a. Revisio *Boehmeriae Sinicae*(中国苧麻属校订)[J]. *Acta Bot Yunan*(云南植物研究), 3(3): 307—328
- Wang WC(王文采). 1981b. Revisio *Boehmeriae Sinicae*(Cont.) (中国苧麻属校订续)[J]. *Acta Bot Yunan*(云南植物研究), 3(4): 401—416
- Zhang B(张波), Zheng CQ(郑长清), Zang GG(藏巩固), et al. 1998a. Classification and evolution of group on the *Boehmeria* in China(中国苧麻属组群分类及演化研究)[J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), 24(6): 775—781
- Zhang B(张波), Zheng CQ(郑长清), Zang GG(藏巩固), et al. 1998b. The comparative morphology of *Boehmeria* in China(中国苧麻属植物比较形态学研究)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 31(2): 56—62

(上接第 858 页 Continue from page 858)

金发藓科 Polytrichaceae

- 狭叶仙鹤藓 * *Atrichum angustatum* (Brid.) Bruch & Schimp. 20077142100
- 小仙鹤藓 *A. crispulum* Schimp. ex Besch. 20077161333
- 小胞仙鹤藓 * *A. rhizophyllum* (Müll. Hal.) Paris 2007714174
- 东亚仙鹤藓 * *A. yakushimense* (Horik.) Mizush. 2007715870
- 小金发藓 *Pogonatum aloides* (Hedw.) P. Beauv. 20077161267
- 穗发小金发藓 * *P. camusii* (Thér.) Touw 20077181810
- 刺边小金发藓褐色亚种 *P. cirratum* subsp. *fuscatum* (Mitt.) Hyvönen 2007714163
- 扭叶小金发藓 *P. contortum* (Menzies ex Brid.) Lesq. 2007714218

- 东亚小金发藓 *P. inflexum* (Lindb.) Sande Lac. 2007714149
- 双珠小金发藓 *P. pergranulatum* P. C. Chen 20077141980
- 南亚小金发藓 *P. proliferum* (Griff.) Mitt. 20077161231
- 苞叶小金发藓 *P. spinulosum* Mitt. 2007714142
- 疣小金发藓 * *P. urnigerum* (Hedw.) P. Beauv. 2007714531
- 台湾拟金发藓 * *Polytrichastrum formosum* (Hedw.) G. L. Sm. 2007715700
- 金发藓 *Polytrichum commune* Hedw. 2007714404

学名前标 * 者为广西新记录种, 学名后的数字编号为标本采集号, 采集人均均为左勤、王幼芳。