

基于 RAPD 分析的中国苏铁属 部分种类亲缘关系探讨

农保选^{1,2,4}, 黄玉源^{3,4*}, 刘 驰¹

(1. 广西农业科学院 水稻研究所, 南宁 530007; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007;

3. 广西大学 农学院, 南宁 530005; 4. 仲恺农业工程学院 生命科学学院, 广州 510225)

摘 要: 利用 21 个筛选出来的 RAPD 引物, 对苏铁属 21 个种的 22 份材料进行分析, 获得 333 个 RAPD 标记, 利用 NTSYS(V. 2. 10e) 软件, 建立了 22 份供试材料的 UPGMA 聚类图, 进而探讨了苏铁属 21 个种类间的亲缘关系。RAPD 聚类分析结合形态学研究结果表明: 多裂苏铁和叉孢苏铁的亲缘关系很近, 聚为一类, 多裂苏铁应为叉孢苏铁的一个亚种。西林苏铁、隆林苏铁、叉孢苏铁、尖尾苏铁、叉叶苏铁、长柄叉叶苏铁、多羽叉叶苏铁、长球果苏铁、贵州苏铁、四川苏铁、短叶苏铁、石山苏铁、宽叶苏铁、十万大山苏铁、元江苏铁、仙湖苏铁、海南苏铁、台湾苏铁、广东苏铁、滇南苏铁相互间的亲缘关系均较远, 支持各自为独立的种。

关键词: 苏铁属; RAPD; 聚类分析; 亲缘关系

中图分类号: Q949.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)02-0167-08

Genetic relationships analysis in some species of *Cycas* in China by RAPD markers

NONG Bao-Xuan^{1,2,4}, HUANG Yu-Yuan^{3,4*}, LIU Chi¹

(1. Rice research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 2. Key Lab of Guangxi

Crop Genetic Improvement and Biotechnology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

3. Aricultural College, Guangxi University, Nanning 530004, China; 4. College of Life Sciences,

Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: In this paper, 333 RAPD markers obtained from 22 materials of 21 species of *Cycas* were analyzed with the screened 21 RAPD primers. The genetic relationships constructed with UPGMA method of NTSYS software quite showed their lineage relationship. According to the result of genetic relationship and the morphological traits analysis, it's concluded that *C. multifida* should be a sub-species of *C. segmentifida*, 20 species that listed as follows: *C. xilingensis*, *C. longlinensis*, *C. segmentifida*, *C. acuminatissima*, *C. micholitzii*, *C. longipetiolula*, *C. multifrondis*, *C. longiconifera*, *C. guizhouensis*, *C. szechuanensis*, *C. brevipinnata*, *C. miquelii*, *C. balansae*, *C. shiwandashanica*, *C. parvulus*, *C. fairylakea*, *C. hainanensis*, *C. taiwaniana*, *C. guangdongensis*, *C. diannanensis*, should be a independent genetic units at species level.

Key words: *Cycas*; RAPD; cluster analysis; genetic relationship

苏铁属植物现已知近 90 余种(含亚种、变种及变型), 广布于世界的亚洲、大洋洲与非洲等地, 研究该属对探讨整个苏铁植物的系统演化关系与现存苏

铁植物的起源及迁移特点、与环境的适应机制等方面有着十分重要的意义(黄玉源, 2001)。此外, 苏铁植物为重要的园林与园艺观赏性植物, 在园林造景、

收稿日期: 2010-08-24 修回日期: 2010-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(30260007)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30260007)]

作者简介: 农保选(1980-), 男(壮族), 广西隆安人, 助理研究员, 主要从事植物遗传资源的保护和利用研究, (E-mail) nongbaoxuan88@gxaas.net。

* 通讯作者: 黄玉源, 教授, 主要从事植物系统与进化和生态学等研究, (E-mail) lqxhy@yahoo.com.cn。

城市绿化、公园珍稀植物观赏园的构建、城市生态环境的改善等方面发挥重要作用。

近几十年来,科研工作者对苏铁属植物进行了大量的野外调查研究,陆续发表了一些新种。但是,关于苏铁属下种间的亲缘演化关系、分类位置还未完全弄清,有的种是否成立还存在一些争议,分子水平上的分类学研究还较少,尤其是用于进行种间及种下各分类等级划分的分子生物学方法的报道还极少。只有少数学者利用同工酶(王发祥等,1996)、DNA 片段测序(Hill,2003)、ISSR 分子标记(马永,2005;Xiao & Gong,2006)对苏铁属的系统与分类进行了研究。RAPD 标记有其它分子标记无法比拟的优势,如技术成熟、简便易行、使用成本低,无需专门设计 RAPD 扩增反应引物,也无须预先知道被研究生物基因组的核苷酸序列,RAPD 分析所需的

DNA 样品量极少等,因而被广泛应用于生物系统学的研究中,如在芸苔属(Demeke 等,1992)、花生属(Halward 等,1992)、小麦属(Joshi 等,1993)、大麦属(Gonzalez 等,1993)及葱属(Wilkie 等,1993)的亲缘关系研究中,以 RAPD 为标记获得的实验结果与经典分类结果非常吻合。然而,除了黄玉源等(2009)利用 RAPD 分子标记对苏铁属的少数几个种亲缘关系进行了探讨外,RAPD 分子标记还少见应用于苏铁属的亲缘关系与分类研究中。

本研究利用 RAPD 标记,对苏铁属在亲缘关系及分类上有争议的 21 个种类(Chen 等,1999;王定跃,2000;黄玉源,2001;Whitelock,2002;Hill,2003)进行分析,旨在从 DNA 分子水平上探明它们之间的亲缘关系和分类地位,以便为它们的保护利用提供合理的建议。

表 1 供试材料及来源
Table 1 Material and their origin in this study

编号 No.	种类 Species	产地 Source site	采集地 Collection site	凭证标本 Voucher No.
1	西林苏铁 <i>C. xilingensis</i>	广西	田林县	黄玉源,农保选 326
2	隆林苏铁 <i>C. longlinensis</i>	广西	隆林县	黄玉源,农保选 330
3	叉孢苏铁 <i>C. segmentifida</i>	广西、贵州	田林县	黄玉源,农保选 331
4	尖尾苏铁 <i>C. acuminatissima</i>	广西	田阳县	黄玉源,农保选 333
5	多裂苏铁 <i>C. multifida</i>	广西	西林县	黄玉源,农保选 335
6	叉叶苏铁 <i>C. micholitzii</i>	广西、云南、越南等	南宁市青秀山公园	黄玉源,农保选 341
7	长柄叉叶苏铁 <i>C. longipetiolula</i>	云南	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 359
8	多羽叉叶苏铁 <i>C. multifrondis</i>	云南、广西	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 362
9	长球果苏铁 <i>C. longiconifera</i>	广西	百色市郊	黄玉源,农保选 374
10	贵州苏铁 <i>C. guizhouensis</i>	贵州、广西、云南	隆林县	黄玉源,农保选 329
11	四川苏铁 <i>C. szechuanensis</i>	广西	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 371
12	短叶苏铁 <i>C. brevipinnata</i>	广西	南宁市青秀山公园	黄玉源,农保选 348
13	石山苏铁 <i>C. miquelii</i>	广西	南宁市青秀山公园	黄玉源,农保选 347
14	宽叶苏铁 <i>C. balansae</i>	云南、越南、泰国等	南宁市青秀山公园	黄玉源,农保选 350
15	十万大山苏铁 <i>C. shiwandashanica</i>	广西	南宁市青秀山公园	黄玉源,农保选 343
16	元江苏铁 <i>C. parvulus</i>	云南	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 360
17	仙湖苏铁 <i>C. fairylakea</i>	广西、广东	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 358
18	海南苏铁 <i>C. hainanensis</i>	海南	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 363
19	台湾苏铁 <i>C. taiwaniana</i>	海南	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 364
20	广东苏铁(<i>C. guangdongensis</i>)	海南、广东	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 368
21	滇南苏铁(雌) <i>C. diannanensis</i>	云南	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 370
22	滇南苏铁(雄) <i>C. diannanensis</i>	云南	深圳市仙湖植物园	黄玉源,农保选 365

1 材料与方 法

1.1 实验材料

供试的苏铁属植物材料基本情况见表 1,所有种类均为采自同一个种群 10~15 株的样本,叶子采集后马上用硅胶干燥(邹喻苹等,2001)。不能立即

提取 DNA 的样品放入-70 ℃冰箱中保存。主要试剂均购买自国内外各有资质的厂家。

1.2 实验方法

采用 CTAB 法(Doyle 等,1987)提取总 DNA,用 1.0%(W/V)的琼脂糖凝胶对各样品的 PCR 扩增产物进行分离检测。

RAPD 的反应体系为:20 μL 反应体积,含纯水

表 2 RAPD 引物序列与扩增结果
Table 2 21 primers used in analysis
and its amplify results

引物 编号 No.	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增 总位 点数 Amp- lified loci	多态性 位点数 Polymor- phic loci	多态性位 点比例(%) Percen- tage of polymor- phic loci
S8	GTCCACACGG	25	25	100
S22	TGCCGAGCTG	14	14	100
S29	GGGTAACGCC	18	17	94.44
S31	CAATCGCCGT	18	17	94.44
S32	TCGGCGATAG	20	20	100
S36	AGCCAGCGAA	17	16	94.11
S38	AGGTGACCGT	19	17	89.47
S40	GTTGCGATCC	14	12	85.71
S41	ACCGCGAAGG	13	11	84.62
S102	TCGGACGTGA	15	14	93.33
S107	CTGCATCGTG	7	5	71.43
S132	ACGGTACCAG	14	13	92.86
S151	GAGTCTCAGG	18	18	100
S156	GGTGACTGTG	18	18	100
S198	CTGGCGAACT	15	15	100
S216	GGTGAACGCT	18	17	94.44
S380	GTGTCGCGAG	18	18	100
S404	GGCGGTTGT	11	10	90.91
S410	TCTGGCGCAC	14	11	78.57
S464	GTGTCTCAGG	13	13	100
S1427	GTGGCCGATG	14	12	85.71
总计 Total	21	333	313	
平均 Average		15.85	14.90	92.86

9.04 μL, 10×Taq buffer 2.0 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 1.6 μL, 2.5mmol/L dNTP 1.6 μL, 10 μmol/L 引物 0.6 μL, 5U/μL Taq 聚合酶 0.2 μL, 10 ng/μL 模板 DNA 5 μL。

RAPD 扩增 PCR 反应程序的设定为：预变性

94℃ 5 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 37℃ 40 s, 延伸 72℃ 110 s, 35 个循环, 最后延伸 7 min, 4℃ 保存。整个反应过程持续时间约 2 h 40 min。

用 121 个随机引物分别扩增形态上差异较大的 3 个种类, 筛选出 21 个扩增带清晰且多态性丰富的引物, 用于 22 个供试材料的进一步分析。

用 NTSYS(V. 2. 10e) 分析软件, 采用 Jaccard 相似系数(Jaccard Similarity coefficient)对 22 个供试材料 RAPD 产物原始数据进行计算, 得到相似矩阵。然后用非加权配对算术平均聚类方法(Un-weighted pair group method using arithmetic average, UPGMA)对其进行聚类分析, 构建苏铁属植物的分子系统与聚类图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选、DNA 扩增结果及多态性分析

首先用 121 个随机引物分别扩增形态上差异较大的 3 个种类, 筛选出 21 个扩增带清晰且多态性丰富的引物(表 2)。用于 22 个供试材料的进一步分析。图 1 为引物 S22 对 22 个供试材料的扩增结果。21 个引物共扩增出 333 条 DNA 带, 各条引物扩增的 DNA 带在 7~25 条之间, 平均每个引物扩增出 15.85 条带。扩增的条带在 200~3 000 bp 之间, 其中多态性条带 313 条, 多态性位点比率为 93.99%。表明苏铁各种间的遗传基础相当复杂, 多态性高, 在 DNA 分子水平有非常大的差异。

RAPD 扩增带的有无记为 1 与 0。在 NTSYS(V. 2. 10e) 软件中进行分析, 遗传相似系数采用 Jaccard 系数法, 各个种类之间的相似系数见表 3, 最后用非加权算术平均聚类法(UPGMA)进行聚类得到系统树(图 2)。

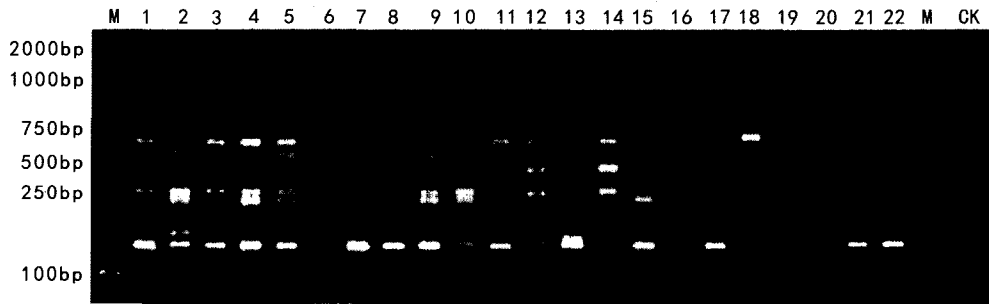


图 1 S22 引物用于苏铁属植物 22 个供试材料的扩增谱带
Fig. 1 Amplified bands of primer S22 of 22 materials of Cycas (M:DNA Marker DL2000)

2.2 聚类分析

相似系数越大,两个分类群的亲缘关系越近,反之,亲缘关系越远。从表 3 可以看出,不同性别的滇南苏铁相似系数最大,为 0.9098。各种间的遗传相似系数在 0.2903~0.7016 之间,各种间的遗传相似系数跨越的幅度较大,说明苏铁属内的遗传背景十

分复杂。多裂苏铁与叉孢苏铁的遗传相似系数最大,为 0.7016,在所有供试种类中,它们之间的亲缘关系最近。隆林苏铁与多羽叉叶苏铁的遗传相似系数最小,为 0.2903,在所有供试种类中,它们之间的亲缘关系最远。

以上各类群的划分,基本符合苏铁属经典分类

表 3 22 个供试材料的 Jaccard 相似系数

Table 3 Similarity coefficient among 22 material according to the Jaccard

种类 Species	1 西林 苏铁	2 隆林 苏铁	3 叉孢 苏铁	4 尖尾 苏铁	5 多裂 苏铁	6 叉叶 苏铁	7 长柄叉 叶苏铁	8 多羽叉 叶苏铁	9 长球 果苏铁	10 贵州 苏铁	11 四川 苏铁
1	1.0000										
2	0.3706	1.0000									
3	0.6029	0.3660	1.0000								
4	0.5503	0.4051	0.4892	1.0000							
5	0.6434	0.3951	0.7016	0.5448	1.0000						
6	0.4481	0.3544	0.4526	0.4228	0.4497	1.0000					
7	0.4194	0.3791	0.4519	0.4218	0.4490	0.4155	1.0000				
8	0.3484	0.2903	0.4122	0.3846	0.3931	0.4394	0.5714	1.0000			
9	0.5283	0.3765	0.4898	0.5467	0.5325	0.3913	0.3987	0.3548	1.0000		
10	0.3684	0.6071	0.3636	0.4204	0.4012	0.3871	0.3677	0.3052	0.3663	1.0000	
11	0.4241	0.3758	0.4565	0.3806	0.4533	0.4306	0.4000	0.3521	0.3780	0.4183	1.0000
12	0.4717	0.3393	0.3907	0.4204	0.4099	0.4145	0.3677	0.3052	0.4072	0.3614	0.4091
13	0.4329	0.3373	0.3882	0.4641	0.4074	0.4211	0.4013	0.3377	0.4048	0.3926	0.4830
14	0.4000	0.4049	0.3987	0.3758	0.3750	0.3354	0.3846	0.3312	0.3352	0.3772	0.3313
15	0.3934	0.3591	0.3750	0.3864	0.3933	0.3801	0.3391	0.3214	0.4302	0.4114	0.4083
16	0.3654	0.3784	0.4211	0.3931	0.4014	0.3857	0.5280	0.3953	0.3544	0.4236	0.4203
17	0.4204	0.3292	0.3724	0.3590	0.4118	0.4069	0.3862	0.3768	0.3494	0.3961	0.5036
18	0.3681	0.3459	0.3819	0.3418	0.3758	0.4069	0.4155	0.3971	0.3023	0.3608	0.3733
19	0.4161	0.3519	0.3691	0.3910	0.3813	0.3841	0.3826	0.3265	0.3550	0.3836	0.3974
20	0.3694	0.3121	0.3546	0.3973	0.3684	0.3706	0.3310	0.3188	0.3333	0.3893	0.3289
21	0.3873	0.3750	0.4026	0.3963	0.4207	0.3727	0.5245	0.4082	0.3539	0.4500	0.3598
22	0.3584	0.3780	0.3791	0.3827	0.4161	0.3500	0.5000	0.3931	0.3409	0.4459	0.3374
种类 Species	12 短叶 苏铁	13 石山 苏铁	14 宽叶 苏铁	15 十万大 山苏铁	16 元江 苏铁	17 仙湖 苏铁	18 海南 苏铁	19 台湾 苏铁	20 广东 苏铁	21 滇南 苏铁(雌)	22 滇南苏 铁(雄)
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12	1.0000										
13	0.4837	1.0000									
14	0.4198	0.3750	1.0000								
15	0.4360	0.3933	0.3944	1.0000							
16	0.4041	0.3826	0.3484	0.3697	1.0000						
17	0.4052	0.4305	0.3774	0.4217	0.4265	1.0000					
18	0.3782	0.3500	0.3436	0.3486	0.4161	0.3878	1.0000				
19	0.3836	0.3899	0.3742	0.3851	0.3916	0.4122	0.5597	1.0000			
20	0.3893	0.3867	0.3270	0.3333	0.3778	0.3611	0.5556	0.5581	1.0000		
21	0.4061	0.4383	0.3882	0.4056	0.6107	0.3987	0.4351	0.4395	0.4106	1.0000	
22	0.3758	0.4250	0.3750	0.3778	0.6094	0.3671	0.4118	0.4167	0.4054	0.9098	1.0000

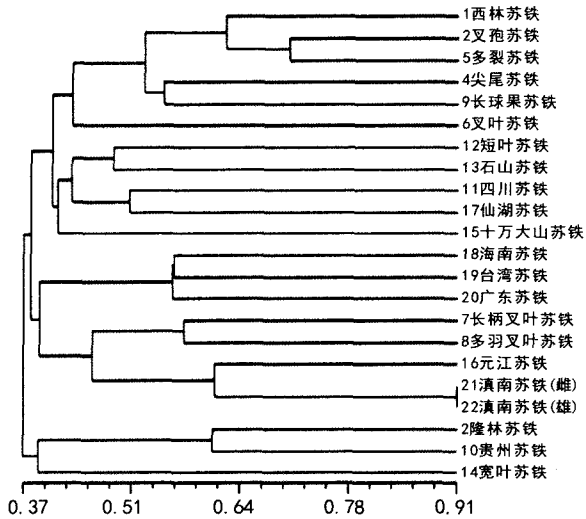


图 2 用 Jaccard 相似系数聚类产生的树状分支图

Fig. 2 Dendrogram generated by using Jaccard coefficient of similarity

的结果。此外,聚类的结果显示:绝大部分分布地理位置相对较近的种类,由于与环境适应上有趋同演化的特点,遗传差异较小,聚类时先聚在一起,如尖尾苏铁(分布于广西)与长球果苏铁(分布于广西)、滇南苏铁(分布于云南)与元江苏铁(分布于云南)等。

3 讨论

3.1 关于 RAPD 方法在苏铁属植物的分类学研究的应用

以往采用 RAPD 方法对苏铁属植物进行种间关系(含种下分类等级)的研究报道还极少,仅有黄玉源等(2009)用来探讨苏铁属下的几个种的亲缘关系,虽然 RAPD 标记相比于 ISSR 标记,是被研究运用得较早的标记,但研究证明其不失为一种好的标记。许多利用 RAPD 和 ISSR 标记对同样材料的比较研究结果证明,两种标记的结果具有非常高的一致性;两者的相关系数达到极显著水平。例如:对黄麻属的同样材料,25 个 RAPD 和 ISSR 引物分别扩增出 329 条和 283 条带,多态比率分别为 89.36% 和 92.5%,虽然 ISSR 检测出种间遗传多样性的分辨率比 RAPD 稍高,但两者 GS 相关系数高达 0.955,即两方法的结果有非常好的一致性(祁建民等,2004)。

陈学军等(2007)认为,与 RAPD 相比,ISSR 标

记检测到的有效等位基因数(N_e)、Shannon 多样性指数(I)、遗传离散度(H_t)和遗传分化系数(G_{st})等遗传多样性参数都较大,因而有更高的多态性检测效率,但从实际的数据看,两者数值相差很小,仅在 0.01~0.04 之间,而且相当一部分的参数值是 RAPD 高于 ISSR。因此,统计分析后得出结论:基于 RAPD、ISSR 的聚类与基于表型数据的聚类之间存在极显著的正相关。

而在采用同样数量引物进行比较研究时,则可以更好地反映两者的效果,如张敏等(2007)在鸢尾属植物的研究中,均采用 12 个引物,RAPD 和 ISSR 分别扩增出 225 和 196 条带,多态性条带分别为 215 条和 196 条,多态性条带百分率分别为 95.56% 和 100.00%;种间总基因多样性分别为 0.3689 和 0.3575,相差值很小。基于 RAPD 和 ISSR 标记得到的鸢尾属 4 个种类间的聚类结果一致,说明二者在种间关系的判定上是一致的。

张敏等(2007,2008)在采用 RAPD 和 ISSR 法对比研究后,由于证明了 RAPD 的简便、成本低等优势,而改为仅采用此方法来研究同样的属的其它种类的遗传关系问题。

本文作者是继在国内首次采用 RAPD 方法研究苏铁属植物的遗传关系后(黄玉源等,2009),在证明其适用于研究苏铁属遗传关系的基础上,更广泛和深入地探究 21 种苏铁属植物的遗传关系,将对于进一步澄清苏铁属植物的亲缘关系及分类上的争议问题提供重要依据,同时也为苏铁属植物资源的保护和利用等方面提供重要的理论参考。

3.2 21 种苏铁属植物的亲缘关系分析

3.2.1 西林苏铁、多裂苏铁、尖尾苏铁、长球果苏铁、隆林苏铁和叉孢苏铁 关于苏铁属的亲缘演化问题,长期以来一直存在争议(Chen 等,1999;黄玉源,2001;Hill,2003)。Chen 等(1999)及王定跃(2000)认为西林苏铁、多裂苏铁、尖尾苏铁、长球果苏铁和隆林苏铁应该归并为叉孢苏铁,为一个种。Whitelock(2002)也把西林苏铁、多裂苏铁、长球果苏铁归入叉孢苏铁。黄玉源(2001)认为虽然西林苏铁与叉孢苏铁有较多相似处,但可作近缘种处理,不能归并。从图 2 来看,所有供试种类中,多裂苏铁与叉孢苏铁最先聚在一起,它们的相似系数虽然较高,达 0.7016,但是根据目前通行的是 Lane & Wang (1993)提出的观点,只要生物与生物之间的遗传相似系数在 ≤ 0.66 ,则为种之间的差异水平;0.67~

0.90 之间可视为亚种、变种及变型等各个分类等级的遗传差异水平; ≥ 0.91 ,可认为是一个种、亚种、变种及变型各分类等级内的不同个体。由于多裂苏铁与叉孢苏铁没有达到相似系数 ≥ 0.91 的水平,所以还不能归为一个种类。本研究认为:多裂苏铁应作为叉孢苏铁的一个亚种对待,根据植物命名法则的优先权原则,由于多裂苏铁后于叉孢苏铁发表,所以多裂苏铁应为叉孢苏铁的一个亚种,叉孢苏铁为原亚种。虽然上述二者又与西林苏铁聚在一起,但是西林苏铁与叉孢苏铁的相似系数仅为 0.6029,二者已经相差很远,明显小于 0.66 的系数指标,本研究认为,西林苏铁应为一个独立的种。西林苏铁与多裂苏铁的相似系数为 0.6433,远小于 0.91 这个各种类之内不同植株间相似系数水平,因此,研究结果同样也不支持把西林苏铁和多裂苏铁归入叉孢苏铁的观点。

尖尾苏铁与叉孢苏铁的相似系数为 0.4892,长球果苏铁与叉孢苏铁的相似系数为 0.4897,尖尾苏铁与长球果苏铁的相似系数为 0.5467,表明三者之间的亲缘关系都较远。此外,形态及解剖学研究表明(黄玉源,2001),尖尾苏铁和长球果苏铁间有较大的差异;本研究结果也表明,将两者与叉孢苏铁做归并是很不合理的。

隆林苏铁与叉孢苏铁的相似系数仅为 0.3660,表明二者的亲缘关系很远,证明其相互间为独立的种,研究结果完全不支持将前者归入后者的观点。

3.2.2 台湾苏铁、海南苏铁和广东苏铁 王发祥等(1996)与黄玉源(2001)均认为广东苏铁与台湾苏铁为同种异名,陈家瑞等(1999)则认为海南苏铁与台湾苏铁各自为独立的种,它们的区别在于海南苏铁的大孢子叶侧裂片数目比台湾苏铁的少等。陈家瑞等(1999)把滇南苏铁、仙湖苏铁归入台湾苏铁,把台湾苏铁叫做“广东苏铁”;本研究作者在深圳仙湖植物园考察时,发现有挂牌为广东苏铁、拉丁名写:*Cycas guangdongensis* 的植株,进而采集其材料,进行此项比较研究。但在文献上,关于其拉丁文的描述还未见,因此暂作为分类学上的裸名,用于分类上的探索性研究。正像 Terrazas(1991)的研究那样,采用不知名的苏铁材料时,给予其 Unknown 或 *Cycas* sp. 代号,即可进行探索研究,以便证明其分类地位,以便今后给予命名,这在植物学研究上为通行的做法。王发祥等(1996)在海南经过广泛调查后,发现苏铁属植物的大孢子叶顶裂片形状变异较

大,台湾苏铁与海南苏铁的模式类型为宽大的三角形,同时还存在从三角形到钻形披针形的一系列过渡类型,侧裂片的数目也有一定变化幅度,海南苏铁应是台湾苏铁的一个饰变类型,将海南苏铁归并于台湾苏铁。黄玉源(2001)认为王发祥等在台湾苏铁的形态描述上将海南苏铁的特征也一同描述在内,后者认为台湾苏铁有多个变异类型,那是在描述台湾苏铁时把海南苏铁的大孢子叶的各形态均包含了进去。黄玉源(2001)对这两个种的解剖学研究结果表明,两个种的显微结构差异很大,认为海南苏铁与台湾苏铁两个均可各自成为独立的种。本研究的 RAPD 分析结果表明,海南苏铁、台湾苏铁与广东苏铁在较小的相似系数水平 0.56 处聚在一起,广东苏铁与海南苏铁的相似系数为 0.5555,广东苏铁与台湾苏铁的相似系数为 0.5581,海南苏铁与台湾苏铁的相似系数为 0.5597,三者的相似系数均达到种级分类水平,均距 0.91 的划归为同一个分类等级处理的水平相差很远,说明海南苏铁、广东苏铁与台湾苏铁的亲缘关系均较远。三者都应各自独立的种。

3.2.3 仙湖苏铁、滇南苏铁和台湾苏铁 陈家瑞等(1999)把仙湖苏铁、滇南苏铁归入台湾苏铁,而后(陈家瑞等,2003)又把仙湖苏铁称作四川苏铁。而黄玉源(2001)经过解剖学研究认为,仙湖苏铁和滇南苏铁为各自独立的种。本研究结果表明,仙湖苏铁与台湾苏铁的相似系数仅为 0.4121,远小于 0.67 的种级划分界限,说明两个种类的亲缘关系相当远,为性状差异很大的两个不同的种。滇南苏铁与台湾苏铁的相似系数仅为 0.4395(雌)[0.4167(雄)],也小于种级划分的界限,表明二者的亲缘关系较远,因此不支持将仙湖苏铁和滇南苏铁归入台湾苏铁的观点。仙湖苏铁和四川苏铁的相似系数仅为 0.5036,表明二者的亲缘关系也较远,因此,支持三者为各自独立的种的观点。

3.2.4 长柄叉叶苏铁、多羽叉叶苏铁和叉叶苏铁 陈家瑞等(1999)把多羽叉叶苏铁归为叉叶苏铁,把长柄叉叶苏铁归并为多岐苏铁,而黄玉源(2001)则认为三者应各自成为独立的种。本研究结果表明,长柄叉叶苏铁和多羽叉叶苏铁虽然聚在一起,但是二者的相似系数仅为 0.5714,小于 0.67 的种级界限,说明二者的亲缘关系较远,加之二者的外观形态也存在较大的差异(黄玉源,2001),本研究结果表明,二者不应归并为同一个种。多羽叉叶苏铁与叉叶苏铁相似系数仅为 0.4394,说明二者的亲缘关系

也比较远,长柄叉叶苏铁和叉叶苏铁的相似系数为 0.4155,二者的亲缘关系也比较远。因此,也不支持把多羽叉叶苏铁或长柄叉叶苏铁归为叉叶苏铁的观点。研究结果支持长柄叉叶苏铁、多羽叉叶苏铁和叉叶苏铁为三个各自独立的种的观点。

3.2.5 元江苏铁、滇南苏铁和宽叶苏铁 陈家瑞等(1999)将元江苏铁和滇南苏铁归并入宽叶苏铁,本研究结果表明,元江苏铁与滇南苏铁虽然聚在一起,但是二者的相似系数为 0.6107(雌)[0.6094(雄)],已达种级分类水平,说明二者的亲缘关系较远,加之二者的形态也有较大的差异(黄玉源,2001),因此,二者应该为独立的两个自然种。Xiao 等(2006)对宽叶苏铁、元江苏铁、十万大山苏铁、潭清苏铁(*C. tanqingii*)和单羽苏铁(*C. simplicipinna*)5 个种类的 ISSR 分子标记的研究表明,元江苏铁不能与宽叶苏铁归并,它们都是各自独立的种,其结果与本研究的结果一致。

3.2.6 隆林苏铁、贵州苏铁与四川苏铁 陈家瑞等(1999)把贵州苏铁归为四川苏铁,而把归并后的四川苏铁的中文名称改为南盘江苏铁。我们认为中文名也是不能随意改动的,也应该具有法律效力,否则会在学术及贸易等方面造成混乱。王定跃(2000)、Whitelock(2002)和马永等(2005)均把隆林苏铁归入贵州苏铁,而王发祥等(1996)和黄玉源(2001)均认为贵州苏铁和四川苏铁应为两个独立的种。本研究聚类分析结果表明,隆林苏铁与贵州苏铁的相似系数仅为 0.6071,已达种级分类水平,表明二者的亲缘关系较远,不应归并为一个种。贵州苏铁和四川苏铁的相似系数为 0.4183,远低于种级分类水平,表明二者的亲缘关系较远,因此,支持三者各自为独立的种的观点。

3.2.7 元江苏铁、十万大山苏铁和宽叶苏铁 陈家瑞等(1999)把元江苏铁与十万大山苏铁归入宽叶苏铁,而王发祥等(1996)和黄玉源(2001)等均认为这三个种成立。本研究结果表明,元江苏铁与宽叶苏铁的相似系数为 0.3484,十万大山苏铁与宽叶苏铁的相似系数为 0.3944,元江苏铁与十万大山苏铁的相似系数为 0.3697,三者的相似系数都十分的小,而且已远远小于种级划分的界限水平,表明三者的亲缘关系较远。因此,不支持把元江苏铁与十万大山苏铁归入宽叶苏铁的观点。这三个种是自然界独立的物种。Pu 等(1999)对宽叶苏铁、元江苏铁、十万大山苏铁等的 SSR 分子遗传标记的研究也证明

了这些种类相互间都是具有与其它种类明显差异的独立的物种,而且都达到种这个分类等级的水平。Xiao 等(2006)的分子系统学研究结果也证明,十万大山苏铁与宽叶苏铁的遗传相似系数远远小于划定为种的等级水平,认为它们之间是相互独立的很好的种,归并是不正确的。这些研究结果与本研究的结果一致。

3.2.8 短叶苏铁和石山苏铁 陈家瑞等(1999)把短叶苏铁归入石山苏铁,本研究结果表明二者虽然聚在一起,但是它们的相似系数仅为 0.4837,小于 0.66 的种级划分的界限水平,说明二者的亲缘关系是相当远。加之二者外观形态也有较大的差异,因此,这两个种应为各自独立的种。

3.2.9 滇南苏铁不同性别的个体间关系 之前的 ISSR 与 RAPD 研究(冯丽春等,1997;刘万勃等,2002;祁建民等,2003;肖炳光,2006;汪爱华等,2007;陈学军等,2007;吴玉香等,2007)均表明,在同一个属内不同的种之间的遗传相似性系数均在 0.66 以下,在亚种、变种等分类等级的不同个体的相似系数则在 0.67~0.90 之间,而在同一个种或变种等分类等级内的不同个体之间如品种、品系的相似系数几乎 90%以上在接近或超过 0.91 以上的水平。这些充分证明了 RAPD 和 ISSR 两种方法均可很好适用于种、亚种、变种和变型及各分类等级内不同个体间的分类学及遗传性状差异的研究。

RAPD 分析结果表明,滇南苏铁雌雄类群的相似系数为 0.9098,说明如果是一个种类的不同植株,即便是不同性别的个体之间其相似系数也是极高的,趋近于 1.0(当然由于同一分类单位的个体之间多少存在微小差异,所以可能会有 0.9999 的现象出现,但理论上没有 1.0 的情况出现)。因此,本结果也进一步确认了本研究方法具有较高的有效性及准确性。

从本研究的 21 个已发表的苏铁属植物种类的材料看,各个种类间的相似系数均相对较小,没有一个足以达到像滇南苏铁不同雌雄类群的个体那样能被归为一个分类单位的 0.91 的界限水平,表明各个种类在遗传物质上确实存在明显差异。综合以上分析及国际命名规则,本研究认为,在所有供试的 21 个种中,有以下 20 个种是成立的:西林苏铁、叉孢苏铁、尖尾苏铁、长球果苏铁、叉叶苏铁、短叶苏铁、石山苏铁、四川苏铁、仙湖苏铁、十万大山苏铁、台湾苏铁、海南苏铁、广东苏铁、长柄叉叶苏铁、多羽叉叶苏

铁、元江苏铁、滇南苏铁、贵州苏铁、隆林苏铁、宽叶苏铁。而多裂苏铁不能笼统的归入叉孢苏铁,多裂苏铁种应为叉孢苏铁的一个亚种。

3.3 关于苏铁属植物种质资源的保护

基于苏铁属植物的珍稀性,如果在分类学上粗略地将在自然界漫长地质时期演化出来的不同的种、亚种、变种及变型错误地归并,将会导致在保护区选点建立、栽培管理等保护措施方面造成严重的错误,而加速这些珍稀“孑遗植物”的灭绝。因此珍惜和慎重地对待这些宝贵植物的遗传多样性,对于指导人类更好地保护、繁殖和利用这些珍稀植物类群具有非常重要的意义。

正如许多植物分类学者和澳大利亚苏铁植物研究学者对待其本国的苏铁属植物分类那样,是亚种、变种和变型的必须给予其正确的分类地位(Hill, 1995, 1996, 2001),而不能均当作是一个分类单位的不同个体来错误地对待,以确保我国为保护苏铁属植物这类属于一级保护、珍稀的植物资源的生物多样性而制定出科学、有效的保护措施,使得各分类等级的类群其个体数得以真正的繁殖扩大,发挥其在各个地区生态系统中特有的、不可替代的作用,以及在各方面造福于人类。

参考文献:

- 马永. 2005. 广西百色地区叉孢苏铁复合体的分类学与遗传多样性研究[D]. 南宁:广西大学
- 王定跃. 2000. 苏铁科植物的形态结构、系统分类与演化研究[D]. 南京:南京林业大学
- 王发祥,梁惠波,陈潭清. 1996. 中国苏铁[M]. 广州:广东科技出版社
- 黄玉源. 2001. 中国苏铁科植物的系统分类与演化研究[M]. 北京:气象出版社:3
- 邹喻苹,葛颂,王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社:16
- Chen JR(陈家瑞),Li N(李楠). 2003. The status in the word and protective countermeasure of *Cycas* germplasm in China(我国苏铁资源在世界上的地位及其保护对策)[J]. *Fore China* (中国林业),11(B):21-23
- Chen XJ(陈学军),Cheng ZF(程志芳),Chen JF(陈劲枫),et al. 2007. Genetic diversity of pepper germplasm with RAPD, ISSR and phenotypic data(辣椒种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 及其表型数据分析)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报),27(4):662-670
- Demeke T, Adams RP, Cibbar R. 1992. Potential taxonomic use random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*[J]. *Theor Appl Genet*,84:990-994
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*,9(1):11-15
- Feng LC(冯丽春),Yang GW(杨光伟),Yu MD(余茂德),et al. 1997. Study of relationships among species in *Morus* using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)(利用 RAPD 对桑属植物种间亲缘关系的研究)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学),30(1):52-56
- Gonzalez JM, Ferrer E. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordean* species[J]. *Genome*,36:1 029-1 031
- Halward T, Stalker HT, Larue E, et al. 1992. Use of single-primer DNA amplification singenetic studies of peanut(*Arachis hypogaea*)[J]. *Plant Mol Biol*,18:315-325
- Hill KD. 1995. The genus *Cycas* (Cycadaceae) in the Indian region, with notes on the application and typification of the name *Cycas circinalis*[J]. *Taxon*,44:23-31
- Hill KD. 1996. A taxonomic revision of the genus *Cycas* (Cycadaceae) in Australia[J]. *Telopea*,7(1):1-63
- Hill KD, Osborne R. 2001. *Cycads in Australia*[M]. East Rosville: Kangaroo Press
- Hill KD. 2003. The families and genera of cycads: a molecular phylogenetic analysis of cycadophyta based on nuclear and plastid DNA sequences[J]. *Int J Plant Sci*,164(6):933
- Huang YY, Nong BX, Liu C, et al. 2009. Improving of RAPD reaction system in *Cycas* and studies on the genetic relationships of some species[J]. *Guihaia*,29(5):569-575
- Joshi CP, Nguyen HT. 1993. Application of the random amplified polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats[J]. *Genome*,36:602-609
- Lane MA, Wang IR. 1993. *Rhododendron albi florum* Hook (Ericaceae): one taxon or two[J]. *Rhodora*,95:11-20
- Liu WB(刘万勃),Song M(宋明),Liu FZ(刘富中),et al. 2002. Assessment of genetic diversity of melon(*Cucumis melo*) germplasm based on RAPD and ISSR(RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质遗传多样性的研究)[J]. *J Agric Biotech* (农业生物技术学报),10(3):231-236
- Pu H, Chiu WL. 1999. Genetic variation in *Cycas* section *stangerioides* using anchored microsatellite primers[A]. *Biology and Conservation of Cycads-Proceedings of the Fourth International Conference on Cycad Biology*[C]. Beijing: International Academic Publishers:334-344
- Qi JM(祁建民),Zhou DX(周东新),Wu WR(吴为人),et al. 2003. The Application of RAPD technology in genetic diversity detection of jute(应用 RAPD 指纹探讨黄麻属种间遗传多样性及其亲缘关系)[J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报),30(10):926-932
- Qi JM(祁建民),Zhou DX(周东新),Wu WR(吴为人),et al. 2004. A comparison between RAPD and ISSR technology in detection of genetic diversity of jute (RAPD 和 ISSR 标记检测黄麻属遗传多样性的比较研究)[J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学),37(12):2 006-2 011

(下转第 226 页 Continue on page 226)

快繁殖穗生根的基质温度以 25~30 ℃ 为宜。

参考文献:

- 徐伟忠. 2006. 一叶成林——植物非试管克隆新技术[M]. 北京: 台海出版社: 71—128
- Feng YL(冯玉龙), Liu EJ(刘恩举), Sun GB(孙国斌). 1995. Influence of temperature of root system on plant(I)——influence of root temperature on plant growth and photosynthesis(根系温度对植物的影响(I):——根温对植物生长及光合作用的影响)[J]. *J Northeast Fore Univ*(东北林业大学学报), **23**(3): 63—69
- Feng YL(冯玉龙), Liu EJ(刘恩举), Meng QC(孟庆超). 1995. Influence of temperature of root system on plant(II)——influence of root temperature on plant metabolism(根系温度对植物的影响(II):——根温对植物代谢的影响)[J]. *J Northeast Fore Univ*(东北林业大学学报), **23**(4): 84—99
- He JM(何觉民), He Y(何仪), Huang JF(黄娇芬), et al. 2009. Researches on the cutting propagation techniques of energy-efficient plant *Euphorbia tirucalli* L. The influence of temperature, photoperiod and air humidity on the cutting survival rate of chilly injured shoot(高效能源植物绿玉树扦插繁殖技术研究 I. 温度、光长和空气湿度对绿玉树冷害嫩枝扦插成活率的影响)[J]. *Guangdong Agric Sci*(广东农业科学), **8**: 49—51
- Huang YJ(黄有军), Wang ZJ(王正加), Zheng BS(郑炳松), et al. 2006. Effect of plant growth regulators on rooting capacity by lignified cuttings of *Carya illinoensis*(植物生长调节剂对薄壳山核桃硬枝扦插生根的影响)[J]. *J Southwest Fore Coll*(西南林学院学报), **26**(5): 42—44, 49
- Li L(李蕾), He QQ(何启泉), Li NY(李妮亚), et al. 2004. Effects of temperature and rooting-reagent ABT on cuttage rooting of several wild-veggie(ABT 生根粉和温度对几种野生蔬菜插条生根的影响)[J]. *J Hainan Nor Univ; Nat Sci Edi*(海南师范大学学报·自然科学版), **17**(2): 165—169
- Su WH(苏文华), Zhang GF(张光飞). 2002. The effect of soil temperature and air temperature on photosynthesis and transpiration of *Primula sinopurpurea*(土壤温度与气温对紫花雪山报春光合作用和蒸腾作用的影响)[J]. *Acta Bot Boreo-Occident Sin*(西北植物学报), **22**(4): 824—830
- Sun M(孙敏), Jiang HR(姜海荣), Liu YF(刘艳芳), et al. 1997. Application of electric heating wire on propagation of *Sabina chinensis* and other plant(电加热线在桧柏等植物繁殖中的应用)[J]. *Inner Mongolia Fore Sci Tech*(内蒙古林业科技), **4**: 40—43
- Wang GL(王关林), Su DX(苏冬霞), Wu HD(吴海东). 2006. Effects of metabolism regulator on survival rate of softwood cutting propagation and its mechanism(代谢调节剂对嫩枝扦插繁殖成活率的影响及其机理)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **33**(2): 395—398
- Wang XR(王小蓉), Zeng WG(曾伟光), Xiong QE(熊庆娥). 2004. Study on the rooting-promoting mechanism of IBA and leaf-retention for softwood cuttings of Japanese late cherry (*Cerasus serrulata* var. *lannesiana*)(IBA 促进日本晚樱绿枝扦插生根机制研究)[J]. *J Southwest Agric Univ; Nat Sci Edi*(西南农业大学学报·自然科学版), **26**(5): 597—600
- Xie ZN(谢志南), Lai RY(赖瑞云), Su MH(苏明华), et al. 2008. Effects of substrate water content on physiological-biochemical metabolism and rooting of *Bougainvillea spectabilis* cuttings(基质含水量对三角梅插穗生根及生理化的影响)[J]. *J Fujian Teach Univ; Nat Sci Edi*(福建师范大学学报·自然科学版), **24**(增刊): 173—176
- Zhao N(赵娜), Ni GY(倪广艳), Li FR(李富荣), et al. 2006. Effects of temperature on photosynthesis of *Merremia boisiana*(温度对金钟藤光合特性的影响)[J]. *Ecol Environ*(生态环境), **15**(6): 1254—1257
- Wang AH(汪爱华), Ding Y(丁毅). 2007. Genetic diversity of wild close relatives of barley(*Hordeum vulgare*) in Tibet of China by using RAPD and ISSR markers(西藏近缘野生大麦 RAPD 和 ISSR 分子标记的遗传多样性)[J]. *J Wuhan Univ; Nat Sci Edi*(武汉大学学报·理学版), **53**(6): 723—730
- Wilkie S, Isaac PG, Slater RJ. 1993. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*[J]. *Theor Appl Genet*, **86**: 497—504
- Whitelock LM. 2002. The Cacads[M]. Portland: Timber Press
- Wu YX(吴玉香), Sun YQ(孙玉强), Chen CQ(陈崇乾), et al. 2007. Analysis of genetic relationship among cotton species (*Gossypium* spp.) by RAPD marker(利用 RAPD 检测棉属种间亲缘关系的研究)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **33**(6): 909—913
- Wu ZY, Peter HR. 1999. Flora of China(Cycadaceae)[M]. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, **14**: 1—7
- Xiao BG(肖炳光). 2006. Assessment of genetic relationships between the flue-cured tobacco varieties by RAPD and ISSR markers(利用 RAPD 和 ISSR 标记分析烤烟品种间遗传关系)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **24**(5): 392—396
- Xiao LQ, Gong X. 2006. Genetic differentiation and relationships of populations in the *Cycas balansae* Complex(Cycadaceae) and its conservation implications[J]. *Ann Bot*, **97**: 807—812
- Zhang M(张敏), Huang SZ(黄苏珍), Qiu S(仇硕), et al. 2007. Analysis of RAPD and ISSR on genetic diversity of *Iris* plants(鸢尾属植物遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境学报), **16**(2): 6—11
- Zhang Min(张敏), Huang SZ(黄苏珍). 2008. RAPD analysis on some germplasm of *Iris* plants(鸢尾属部分植物种质资源的 RAPD 分析)[J]. *Acta Bot Boreo-Occident Sin*(西北植物学报), **28**(5): 933—939

(上接第 174 页 Continue from page 174)