

濒危植物天目铁木遗传多样性的 RAPD 分析

王祖良¹, 丁丽霞², 赵明水¹, 程晓渊¹, 沈 乾³

(1. 浙江天目山国家级自然保护区 管理局, 浙江 临安 311311; 2. 浙江林学院 环境科技学院, 浙江 临安 311300;
3. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 濒危植物天目铁木 *Ostrya rehderiana* 现仅在天目山残存 5 株野生植株, 是国家一级保护植物。为研究该物种繁殖与复壮的有效途径, 利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 标记, 对这 5 株天目铁木的遗传多样性和遗传分化进行基因组 DNA 多态性分析, 统计 18 个扩增较为稳定的引物在 5 个 DNA 样品中扩增的电泳带总数与多态带的数目。结果显示: 共扩增出 176 个 DNA 片段, 片段大小为 200~2 800 bp, 其中多态性谱带为 88 条, 占 50%, 表现出了丰富的 RAPD 多态性。根据遗传距离, 利用 UPGMA 构建了个体亲缘关系树状图。结果表明, 4 号和 5 号植株间亲缘关系最近, 遗传距离为 0.133 5, 1 号和 3 号植株间亲缘关系最远, 遗传距离为 0.461 0, 1 号植株与其他 4 株的亲缘关系均较远, 遗传距离为 0.366 5~0.461 0, 聚类时被聚在其他 4 株之外。这一结果与 5 株间物理距离分布的位置差异相符。图 5 表 2 参 8

关键词: 植物学; 天目铁木; 随机扩增多态性 DNA; 遗传多样性

中图分类号: S718.46 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2008)03-0304-05

Genetic diversity of *Ostrya rehderiana* revealed by RAPD markers

WANG Zu-liang¹, DING Li-xia², ZHAO Ming-shui¹, CHENG Xiao-yuan¹, SHEN Qian³

(1. Management Office, National Nature Reserve of Mount Tianmu, Lin'an 311311, Zhejiang, China; 2. School of Environmental Sciences and Technology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *Ostrya rehderiana* is under first class national in China, only distributing in National Nature Reserve of Mount Tianmu, Zhejiang Province, and having only five wild trees (namely No. 1, No. 2, No. 3, No. 4, and No. 5) in the world. The five trees were fingerprinted using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers with 18 primers being screened. A total of 176 DNA base pair (bp) fragments ranging from 200 bp to 2 800 bp were amplified with 88 of these bands being polymorphic (50%). Based on genetic distances, relationships among the five individuals were constructed using Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Genetic distance positively correlated with geographic distance. Because No. 1 was located further from the other four, it was clustered into one group alone. Therefore, more attention should be given to the tree of No. 1 [Ch, 5 fig. 2 tab. 8 ref.]

Key words: botany; *Ostrya rehderiana*; RAPD; interspecies genetic diversity

1 天目铁木现状

天目铁木 *Ostrya rehderiana* 属桦木科 Betulaceae, 为浙江天目山特有的珍稀树种, 野生植株仅存 5 株, 是国家一级保护植物^[1]。该树种雌雄同株, 单性花, 雄花为葇荑花序, 单生或簇生于叶腋, 下垂, 淡黄色, 3 月底至 4 月上旬散粉。雌花具膜质苞片, 青绿色, 着生于枝梢, 聚生或稀疏的总状花

收稿日期: 2007-11-09; 修回日期: 2008-01-18

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y305331); 浙江林学院浙江省现代森林培育技术重点实验室开放基金资助项目(200503)

作者简介: 王祖良, 工程师, 硕士, 从事自然保护区资源管理研究。E-mail: wzuliang@zj.com

序, 于4月中旬开放。由于雌雄花花期错落, 导致结实率低, 仅为20%~30%, 果实干瘪粒较多。种实于10月成熟, 具苞片(即果翅), 与果脐相连, 去翅果实为瓜子形, 果皮淡褐色。种子吸水主要通过苞片的网脉进入, 胚的发育由子叶供给营养, 但其生理后熟, 物种的自我更新能力差。干藏或湿存都不宜种子保存, 会导致大部分丧失活力。利用传统的种子繁育手段, 往往会把果实苞片去掉, 这又导致种子仅靠种脐吸水, 出现供水不足, 影响吸胀萌发^[2-5]。再加上人为的生产活动对原生植株的破坏, 导致了该物种的濒危现状。

1985年开始, 浙江林学院林学系和天目山国家级自然保护区管理局科研人员开展了天目铁木的有性和无性繁育研究, 均取得了突破性进展。通过对种子的低温层积、赤霉素(GA)处理及对土壤、水分、光照等方面的精准化管理, 有性繁育获得成功。与此同时, 进行了无性繁育研究, 在插条选择、扦插季节、土壤、水分、光照和温度等方面都进行严格的控制, 取得了46%~55%的成活率。1985-1990年间的繁育研究成功培育了500余株苗木, 有200多株苗木定植于天目山国家级自然保护区内, 另外在南京、杭州、临安等地也有少量移栽^[2-5]。

上述培育苗木均是5株野生植株的子代, 为进一步探讨其濒危机制, 需对现存的天目铁木进行遗传多样性研究, 利用RAPD分子标记技术对天目铁木5个残存野生植株进行了遗传差异的分析。

2 材料与方 法

2.1 材 料

2007年7月, 在西天目山南坡山麓大有村采集5株野生植株(图1)幼嫩的叶片, 用塑料袋包装, 直接储存于浙江林学院浙江省现代森林培育技术重点实验室-70℃冰箱备用。

2.2 基因组 DNA 提取与质量浓度测定

基因组DNA提取参照Tai等^[6]和顾红雅等^[7]的CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法, 并经部分改良^[8]。

新鲜叶片在液氮中迅速研磨至白色粉末, 研磨时加入少量聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 将粉末转入2 mL离心管中, 加入65℃预热提取液800 μL [20 g·L⁻¹ CTAB, 0.1 mol·L⁻¹ Tris(三羟甲基氨基甲烷盐), 0.02 mol·L⁻¹ EDTA(乙二胺四乙酸), 1.4 mol·L⁻¹ NaCl(氯化钠)], 20 μL β-巯基乙醇, 65℃水浴保温40 min, 其间不断摇动; 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)混合液, 混匀, 1.2万 r·min⁻¹离心10 min; 取上清, 加等体积饱和酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1), 混匀, 1.2万 r·min⁻¹离心10 min; 取上清, 加等体积氯仿: 异戊醇(24:1), 混匀, 1.2万 r·min⁻¹离心10 min; 取上清, 加入2/3体积预冷的异丙醇, 混匀, 钩出沉淀, 体积分数为70%乙醇600 μL洗涤2次, 真空干燥, 用200 μL TE(Tris/EDTA)缓冲液溶解, 加入2 μL RNase(多头绒孢菌核糖核酸酶), 37℃水浴保温30 min, -20℃保存备用。

用Genequantpro(Pharmacia)检测基因组DNA, DNA质量浓度(mg·L⁻¹)=光密度值A₂₆₀×50×稀释倍数。用10 g·kg⁻¹琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统(Pharmacia)检测所提DNA的完整性, PCR(聚合酶链式反应)扩增来检测DNA提取的效果。

2.3 PCR 扩增及产物鉴定

RAPD(随机扩增多态性DNA)-PCR扩增在Perkin-Elmer 9600(PE 9600)扩增仪上进行, 每20 μL反应体系中含2.5 mg·L⁻¹模板, 0.3 μmol·L⁻¹引物, 1.116 9 mkat·L⁻¹ Taq酶, 0.2 mmol·L⁻¹ dNTP, 2.5 mmol·L⁻¹ Mg²⁺, 10×Buffer 2 μL(所有试剂均购自上海生物工程公司)。扩增程序为: 94

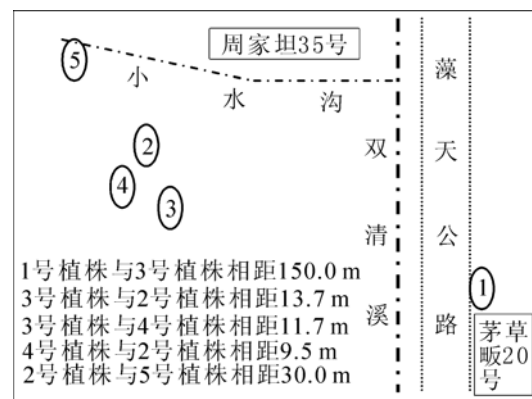


图1 5株野生植株分布示意图

Figure 1 The distribution of the five wild trees of *Ostrya rehderiana*

℃预变性 300 s; 94 ℃变性 30 s, 38 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 90 s, 38 个循环; 72 ℃延伸 420 s; 4 ℃保温。扩增产物经 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测, 于 VDS (微达斯) 成像系统 (Pharmacia) 中成像。

2.4 数据统计与分析

统计 18 个扩增较为稳定的引物在 5 个 DNA 样品中扩增的电泳带总数与多态带的数目, 在电泳图谱上同一个位点上有电泳带记为 1, 无电泳带记为 0, 作 0/1 矩阵输入计算机。用 POPGEN 32 计算遗传距离, 构建树状图。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取与引物筛选

CTAB 法提取的 DNA 纯度和含量均较高, 电泳结果条带清晰、干净 (图 2)。用 2 个样品在 300 个 RAPD 引物中, 成功筛选得到扩增性强和稳定性好的引物 18 个用于最后扩增, 图 3 是引物筛选结果, 表 1 是复筛出的 18 个引物的序列和对 5 个 DNA 扩增的情况统计。

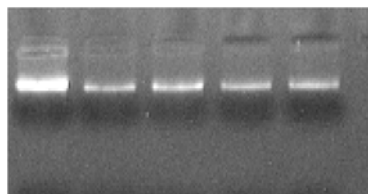


图 2 DNA 电泳结果

Figure 2 The result of the DNA electrophoresis

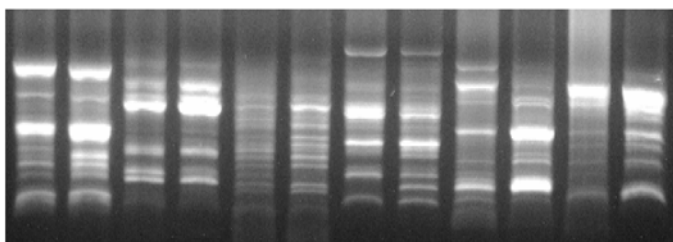


图 3 引物筛选结果

Figure 3 The result of the primers screened

3.2 RAPD 多态性分析

18 个引物共检测到 176 个位点, 位点范围为 200 ~ 2 800 bp。表 1 列出了 18 个引物扩增的谱带数、多态带及多态带百分比, 其中扩增带数最多的引物是 S128, 共 14 条; 最少的是 S131 和 S198, 各为 7 条; 平均每个引物扩增 9.8 条带, 其中 88 个条带表现为多态性, 占总带数的 50%; 多态性最高的是 S148, 多态带百分比达到 87.5%。这表明 5 个单株间的 RAPD 多态性并不丰富。图 4 是 S125 和 S127 引物的扩增结果。

表 1 引物及其序列和扩增结果

Table 2 List of twenty primers, their sequences, and amplification results

引物	序列 5' ~ 3'	总扩增带数	多态带数	多态带百分比/ %
S100	TCTCCCTCAG	8	4	50.0
S117	AGGGCCGTCT	9	6	66.7
S118	GTCAGGGCAA	9	6	66.7
S119	CCAGTACTCC	11	8	72.7
S122	CCGCCTAGTC	13	9	69.2
S125	AGTCGGGTGG	10	5	50.0
S126	CTGGGTGAGT	12	6	50.0
S127	AAAGGGGTCC	12	6	50.0
S128	GAGTCAGCAG	14	11	78.6
S131	TCTGGACGGA	7	2	28.6
S133	GACCAATGCC	10	1	10.0
S148	GAAGCCAGCC	8	7	87.5
S153	AGATCCCGCC	8	5	62.5
S158	CCTGCTCATC	8	4	50.0

续表 1

引物	序列 5'~3'	总扩增带数	多态带数	多态带百分比/%
S191	AGTCGGGTGG	8	1	12.5
S198	GGCTGGTTC	7	1	14.3
S220	GACCAATGCC	12	3	25.0
S221	CATCGCCGCA	10	3	30.0
合计		176	88	50.0

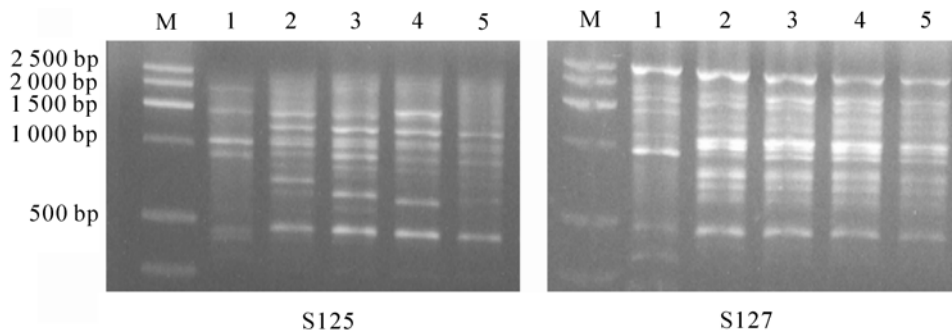


图 4 S125 和 S127 引物扩增结果

Figure 4 The result of amplification with S125 and S127 primers amplified

3.3 遗传距离聚类分析

用 POPGEN 32 软件分析 RAPD 扩增结果，得到天目铁木株间遗传距离矩阵(表 2)，亲缘关系聚类图(图 5)。结果显示：5 个植株间，5 号植株与 4 号植株之间遗传距离最小，为 0.133 5，表明两者亲缘关系最近；3 号植株与 1 号植株之间遗传距离最大，为 0.461 0，表明两者亲缘关系最远。而 1 号植株与其他 4 株之间的遗传距离为 0.366 5~0.461 0，表现出较远的亲缘关系，聚类时被聚在其他 4 株之外。

表 2 遗传距离矩阵

Table 2 Matrix of genetic distances

个体编号	1	2	3	4	5
2	0.366 5				
3	0.461 0	0.180 1			
4	0.416 9	0.200 7	0.207 6		
5	0.434 3	0.173 3	0.265 2	0.133 5	

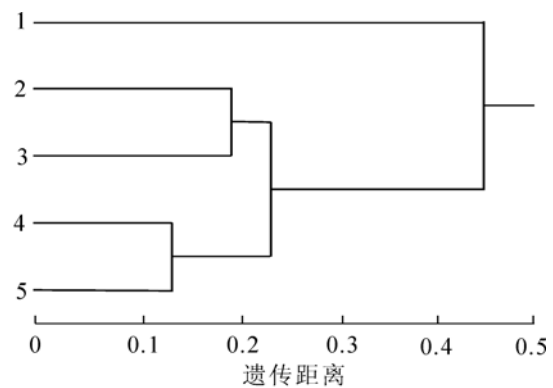


图 5 遗传距离聚类图

Figure 5 Dendrogram based on the genetic distances generated

4 讨论

4.1 野生天目铁木植株间遗传多样性与分布的物理距离

实验以残存的 5 株天目铁木植株作为研究对象，RAPD 标记分析得出的遗传差异与现实的植株分布差异是相符的。其中 1 号植株表现出与其他 4 株有比较大的差异，遗传距离为 0.366 5~0.461 0，聚类时被聚在其他 4 株之外，并与 2~5 号植株相距 400 m 左右；2~5 号植株间的遗传距离都不大，

物理距离也是很贴近的,而遗传距离最小的是5号植株与4号植株之间,为0.1335,物理距离上也是相距最近的2个单株。

4.2 对天目铁木物种保护的建

研究表明,1号植株与其他几株有较大的遗传差异,应予重点保护。由于1号植株半个世纪前就遭雷击,现已出现自顶向下的腐烂,生长势不理想,必须从速予以抢救。从物种的繁衍规律来看,一定要有相当的遗传变异才能实现自然的恢复。所以,当务之急就是需要加强对5个野生植株的保护。近期,管理机构应组织人员对野生植株所在范围进行表土翻耕,竹根清理,并作围栏加以保护。从长远看,必须每年收集种子,培育苗木,建立人工群体,通过保护有限的遗传突变和重组类型最大限度地保护天目铁木的遗传多样性,为该物种的长期生存增加可能性。

致谢: 研究得到浙江林学院浙江省现代森林培育技术重点实验室王正加副教授的悉心指导,野外作业中得到天目山国家级自然保护区管理局刘亮、徐良先生的大力支持,谨致谢意!

参考文献:

- [1] 国家林业局,农业部. 国家重点保护野生植物名录(第1批)[EB/OL]. 1999-09-09 [2007-11-15]. http://www.chinabiodiversity.com/feedback/intro_59.htm.
- [2] 张若蕙,张金谈,邹达明,等. 天目铁木的花及花粉形态[J]. 浙江林学院学报, 1988, 5(1): 93-96.
- [3] 管康林,陶银周. 濒危树种——天目铁木的现状和繁殖[J]. 浙江林学院学报, 1988, 5(1): 90-92.
- [4] 张若蕙,沈锡康,杨逢春. 天目铁木生长节律的观察[J]. 浙江林学院学报, 1990, 7(1): 58-62.
- [5] 管康林,陶银周. 天目铁木的生长特性与繁殖[J]. 植物引种驯化集刊, 1993(8): 171-179.
- [6] TAI T H, TANKSEY D D. Rapid isolation of total DNA from dehydrated plant tissue [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1990, 8(4): 229-303.
- [7] 顾红雅,瞿礼嘉. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社, 1998: 3.
- [8] 王正加,黄坚钦,郭传友,等. 山核桃 RAPD 反应体系的优化[J]. 浙江林学院学报, 2003, 20(4): 429-433.