

九龙江口红树植物分子分类的初步研究^{*}

周涵韬, 林 鹏, 郑文竹, 孙 晟, 郑志强, 林 凡, 陈鹭真

(厦门大学生物系, 福建 厦门 361005)

摘要: 本研究工作以福建九龙江口龙海红树林自然保护区浮宫种苗园内 7 种红树植物为材料, 采用改进的 CTAB 法获得了纯度较高(A_{260}/A_{280} 在 1.6~2.0 之间), 得率高(DNA 平均得率约为 $120 \times 10^{-6} \text{ mg/mg}$, Fresh Weight), 片段完整(片段大小约为 23kb 左右)的基因组 DNA, 并运用 RAPD 技术对这 7 种红树植物进行了遗传多样性分析. 从 30 个 10-mer 随机引物中筛选出 9 个有效引物, 并利用这 9 个有效引物共扩增出 352 条 DNA 带. 利用 UPGMA 法对红树植物的 7 个种间的亲缘关系进行聚类分析, 得出 7 个种的 DNA 分子分类系统图, 并与传统的分类进行比较, 发现结果相符, 从而确定了 RAPD 技术用于红树植物分子分类研究的可行性, 并为从分子水平研究红树植物遗传多样性, 保护、开发和利用红树林资源提供科学依据.

关键词: 红树植物; RAPD; 分子分类

中图分类号: Q753

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2001)01-0066-06

红树林是生长于热带、亚热带陆海交汇的海湾河口潮间带的盐生木本植物群落. 它在维护海岸生态平衡、防风减灾、护堤保岸; 环境污染监测、净化与防治等上发挥重要的作用. 同时, 它是热带河口海湾生态系重要的第一性生产量贡献者, 为人们提供各种产品; 它蕴藏着丰富的动植物、微生物资源. 目前国内外对红树植物开展了大量的生物学研究工作, 成果多集中在生态学、生理学、生物化学等领域^[1], 而分子生物学的研究工作正处于起步阶段. 对红树植物的分类主要通过形态比较^[2], 细胞学观察等进行研究, 目前红树植物某些种属的分类关系仍不确定. 自 1990 年建立^[3,4]以来, 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术已广泛用于种质资源分析^[5,6]、品种鉴定^[5-7]、遗传连锁图谱的构建^[8,9]、基因定位^[10,11]等领域. 本文通过对福建九龙江口 7 种红树植物的 RAPD 研究, 在 DNA 分子水平上探讨红树植物不同种属之间的遗传关系, 从而为进一步开发和充分利用我国红树林资源打下基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 红树植物样品 实验用 7 种红树植物嫩叶样品为白骨壤(*Avicennia marina*)、桐花树(*Aegiceras corniculatum*)、无瓣海桑(*Sonneratia apetala*)、秋茄(*Kandelia candel*)、木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)、海莲(*Bruguiera sexangula*)、尖瓣海莲(*Bruguiera sexangula* var.

* 收稿日期: 1999-12-06

基金项目: 国家教育部高等学校博士点基金资助项目(1999038410)

作者简介: 周涵韬(1970~), 男, 硕士, 讲师.

rhyn-
chopetala), 均采自福建省浮宫红树林自然保护区, 采集时间为 1999 年 1 月 23 日。

1.1.2 试剂 Taq DNA 聚合酶、单核苷酸(dNTPs)、分子 Marker、CTAB 等均为 Promega 公司产品; 所用引物为 Operon 公司产品; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器 PCR 仪: 480 型, PE 公司产品; 紫外分光光度计: 752 型; 电泳仪: Power300 型, BIO-RAD 公司产品; 凝胶成像系统: GDS8000 型, UVP 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 红树植物 DNA 的提取及检测 红树植物总基因组的提取, 采用改进的 CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵) 法。称取 0.5g 红树植物嫩叶, 加液氮研磨成粉状, 加入预热至 65℃ 的 CTAB 抽提缓冲液 (1%β-巯基乙醇, 2%CTAB, 1.4mol/dm³ NaCl, 20mmol/dm³ EDTA, 100mmol/dm³ Tris-HCl, pH8.0) 混匀, 65℃ 恒温 1h。加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1) 抽提。于 15 000×g 离心 5min, 取上清液, 加入 2/3 体积异丙醇混匀, 置于一 20℃ 冰箱中 60min。于 15 000×g 离心 10min。弃上清液, 沉淀用 70% 的酒精洗两次, 待酒精挥发干后, 加入 400mm³ TE 缓冲液溶解。加入 RNase 至终浓度为 50ng/cm³, 置于 37℃ 恒温水浴 60min。加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 抽提两次, 于 15 000×g 离心 5min。取上清液, 加入 1/10 体积 3mol/dm³ NaCl 和 2 倍体积的无水乙醇, 置于一 20℃ 冰箱中 90min。于 15 000×g 离心 10min, 弃上清液, 沉淀用 70% 的酒精洗两次。待酒精挥发干后, 加入 50mm³ TE 缓冲液溶解。

1.2.2 DNA 纯度、浓度的测定和电泳检测 将 DNA 溶液稀释后以 TE 缓冲液为空白对照测其在 260nm 及 280nm 波长的紫外吸收, 计算 DNA 的浓度, 得率并判断其纯度。用 1× TBE 配制的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测判别 DNA 分子的大小及基因组是否降解。将符合条件的样品稀释至 20ng/mm³ 用于 RAPD 分析。

1.2.3 RAPD 反应 聚合酶链式反应 (PCR) 体系 Taq DNA 聚合酶 1.5U, 引 (5μmol/dm³) 2mm³, dNTPs (1mmol/dm³) 2.5mm³, MgCl₂ (2mmol/dm³) 2.5mm³, 模板 DNA 50ng, 加超纯水至 25mm³, 反应体系用 20mm³ 石蜡油覆盖。PCR 循环设置为: 94℃ 变性 1min, 36℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 2min, 共 40 个循环, 然后 72℃ 延伸 7min 最后将结果置于 4℃ 冰箱保存。

1.2.4 电泳及观察 将 PCR 扩增产物在用 1× TBE 配制的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离。EB 直接加入胶中, 终浓度约为 0.5mg/dm³。在 3V/cm 的恒压下电泳 2.5h。电泳结束后在紫外检测仪上观察记录扩增产物的泳带, 并在凝胶成像系统中保存图像。

1.2.5 数据的统计与分析 按琼脂糖凝胶同一位置上 DNA 带的有无进行统计, 有带的记为 '1' (包括弱带), 无带的记为 '0'。利用 UPGMA (unweighted pair group mean average) 统计软件对所得数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

提取的 7 种红树植物 DNA 溶液的紫外吸收, A_{260} 和 A_{280} 值见表 1, 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。

由表 1 结果可见, 7 种红树植物的 A_{260}/A_{280} 值在 1.6 ~ 1.8 之间, DNA 纯度较好。由图 1 可知, DNA 的片段大小均一, 长度为 23kb。

表 1 7 种红树植物 DNA 提取结果

Tab. 1 Results of DNA extraction of 7 mangroves

种 名	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	得率($\times 10^{-6} m/m F.G.$)
白骨壤	12.1	6.40	1.880	121
桐花树	12.5	6.95	1.797	125
无瓣海桑	10.4	6.20	1.677	104
秋 茄	11.2	6.90	1.623	112
木 榄	13.9	8.58	1.620	139
海 莲	12.5	7.52	1.666	125
尖瓣海莲	11.8	6.76	1.744	118

2.2 引物的筛选及扩增结果

从 30 个 10-mer 随机引物中筛选出 9 个有效引物(表 3). 这 9 个有效引物在 7 种红树植物中共扩增出 352 条 DNA 带, 平均每个引物扩增带数为 44 条, 引物扩增得到 PCR 指纹图谱见图 2. 并对 DNA 带型进行统计.

表 2 9 个有效引物在红树植物 7 种 DNA 的扩增情况

Tab. 2 Amplifications of 9 effective primers on 7 mangroves

引 物 名	序列(5' -3')	总 带 数	带数/样品
OPG05	CTGAGACGGA	43	6
OPG08	TCACGTCCAC	64	9
OPG15	ACTGGGACTC	36	5
OPG18	GGCTCATGTG	46	7
OPH01	GGTCGGAGAA	36	5
OPH03	AGACGTCCAC	36	5
OPH11	CTTCCGAGT	34	5
OPH19	CTGACCA GCC	48	7
S128	GGGATATCGG	47	7

2.3 红树植物 RAPD 聚类分析

利用 UPGMA 统计软件对 9 个有效引物在 7 种红树植物 DNA 中扩增产生的共 352 条 DNA 带进行分析. 首先得到的是 7 种红树植物间的遗传距离矩阵(表 3). 遗传距离越大, 其种间的亲缘关系也就越远. 在表 3 的基础上进而作出 7 个种的 DNA 分子分类系统图(图 3).

表 3 7 种红树植物种间的遗传距离矩阵

Tab. 3 Genetic distance matrix among 7 mangroves

红树植物	白骨壤	桐花树	无瓣海桑	秋茄	木榄	海莲	尖瓣海莲
白骨壤	0.00	0.88	0.90	1.08	0.97	0.95	0.89
桐花树	0.88	0.00	0.97	0.99	1.13	1.13	1.14
无瓣海桑	0.90	0.97	0.00	1.17	1.11	1.21	1.16
秋茄	1.08	0.99	1.17	0.00	0.58	0.69	0.78
木榄	0.97	1.13	1.11	0.58	0.00	0.50	0.64
海莲	0.95	1.13	1.21	0.69	0.50	0.00	0.48
尖瓣海莲	0.89	1.14	1.16	0.78	0.64	0.48	0.00

从图 3 中可以清楚的看到, 7 个种被分为 A、B 两个大组. A 组中包括 3 个种: 白骨壤、无瓣海桑、桐花树; B 组中包括 4 个种: 秋茄、木榄、海莲、尖瓣海莲.

3 讨论

3.1 DNA 提取方法

红树植物大多为盐生木本植物, 其叶片组织含有大量多糖、脂类、色素及酚类化合物^[12]. 这些化合物将影响红树植物 DNA 的纯度和得率, 导致 RAPD 反应无法进行. 本实验采用 CTAB 法提取红树植物核基因组, 其中的 CTAB 能很好地去除这些杂质, 所得 DNA 纯度较高, 得率高, 可用于 RAPD 分析.

3.2 RAPD 反应的重复性

RAPD 反应采用合成的 10 核苷酸长单个随机引物, 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增.

RAPD 分析在技术上简便易行, 对所需设备要求也不高, 只要微量 DNA 样品就能进行分析. 因此它使研究者可以快速高效地获取涉及许多个体或基因型的许多位点的 DNA 序列多态性资料. 由于 RAPD 技术本身灵敏度高, 易受实验操作和反应条件等影响, 因此, RAPD 分析的重复性问题一直是国内外研究者关注的问题. 从本研究的结果看, 对于红树植物而言采用 CTAB 法, 提取纯度较高的 DNA 作为模板, 同时充分了解 RAPD 反应各成分影响作用的基础上, 优化最适反应条件, 规范操作, RAPD 反应是能够很好地被重复.

3.3 RAPD 聚类分析在红树植物分子分类中的应用

国外在分子分类学方面的报道较多^[5, 6, 14, 15]. 国内在这一领域也已展开了广泛的研究^[16, 17], 在人^[18]、大豆^[19]、丁香^[20]、芥菜^[21] 等上都有较多的报道. 但在红树植物上目前的报道较少.

本实验对 9 个 10-mer 随机引物在 7 种红树植物上扩增的 352 条 DNA 带(图 1), 运用 UP-GMA 统计软件进行分子聚类分析, 建立了这 7 种红树植物的亲缘关系的分子分类图(图 3). 7 个种分为 A、B 两个大组, A 组中包含三个种, B 组中包含 4 个种. 白骨壤(马鞭草科)、桐花树(紫金牛科)、无瓣海桑(海桑科)同属于 A 组. 由表 3 可知, 白骨壤与桐花树的遗传距离为 0.88 而与无瓣海桑的遗传距离为 0.9, 无瓣海桑与桐花树的遗传距离达 0.97. 可见这三种红树植物虽然聚类在同一组, 但由于彼此之间的遗传距离较远(平均 0.93), 因此符合传统形态分类属于不同科; 而同属红树科的秋茄、木榄、海莲、尖瓣海莲经分子聚类一起出现在 B 组, 它们的平均遗传距离为 0.6, 分子分类也表明它们聚类为同一科. 从图 3 中也可以看出, 相对于秋茄而言, 木榄、海莲和尖瓣海莲这三者的亲缘关系更近, 平均遗传距离为 0.54, 这和传统的分类学相吻合, 因为秋茄属于秋茄属, 而后三者同属于木榄属. 进一步分析可以看出, 尖瓣海莲和海莲的亲缘关系很近, 遗传距离为 0.48, 而与木榄的遗传距离为 0.64. 目前有两种观点, 一种认为尖瓣海莲是海莲的一个变种, 另一种认为尖瓣海莲是海莲和木榄的杂交种. 我们的实验结果, 支持尖瓣海莲是海莲变种的观点.

通过本实验可以看出, RAPD 标记技术能较为客观的反应出红树植物的遗传多样性及其相互关系, 它应用于红树植物的分子分类研究是切实可行的. RAPD 技术对于红树资源的鉴定, 分类及遗传多样性评价是一种有效的手段. 因此 RAPD 技术结合传统的资源鉴定方法必将进一步促进红树资源的开发、保护和利用.

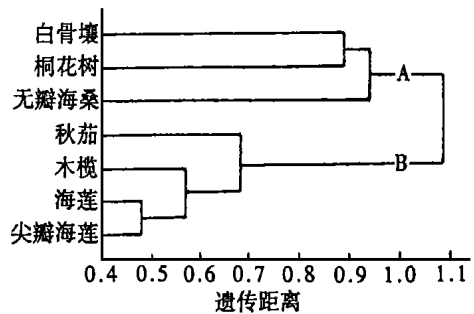


图 3 7 种红树植物的分子分类系统

Fig. 3 DNA molecular dendrogram of 7 mangrove species

参考文献:

- [1] 林鹏. 中国红树林生态系 [M] . 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 林鹏. 红树林 [M] . 北京: 海洋出版社, 1994.
- [3] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J] . *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(24): 7 213~7 218.
- [4] Williams J G K, Kubelic A R, Livak K J, *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J] . *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(22): 6 531~6 535.
- [5] Yang X, Quiros C. Identification and Classification of Celery Cultivars with RAPD Markers [J] . *Theor Appl Genet*, 1993, **86**: 205~212.
- [6] Stiles J I, Lemme C, Sondur S, *et al*. Using amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationship among papaya cultivars [J] . *Theor Appl Genet*, 1993, **85**: 697~701.
- [7] Hu J, Quiros C F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers [J] . *Plant Cell Rep*, 1994, **10**: 505~511.
- [8] Rowland L J, Levi A. RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species [J] . *Theor Appl Genet*, 1994, **87**: 863~868.
- [9] 陈洪, 朱立煌, 徐吉臣, 等. 水稻 RAPD 分子连锁图谱的构建 [J] . *植物学报*, 1995, **37**: 677~684.
- [10] Martin G B, Williams J G K, Tanksley S D. Rapid identification of markers linked to a Pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines [A] . *Proc Natl Acad Sci USA* [C] , 1991, **88**: 2 336~2 340.
- [11] Penner G A, Chong J, Levesque L M, *et al*. Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene Pcg3 [J] . *Theor Appl Genet*, 1993, **85**: 702~705.
- [12] 邓用川, 曾驰, 徐立新, 等. 海刀豆、红树 DNA 的提取 [J] . *海南大学学报(自然科学版)*, 1994, **12**(1): 33~35.
- [13] Williams J G K, Hanafey M K, Rafaslo K, *et al*. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers [J] . *Methods in Enzymology*, 1993, **218**: 704~740.
- [14] Demeke T, Adams R P, Chibbar R. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) : a case study in Brassica [J] . *Theor Appl Genet*, 1992, **84**: 990~994.
- [15] Castiglione S, Wang G, Damiani G, *et al*. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic Studies of sliteoplar (Populus spp.) clones [J] . *Theor Appl Genet*, 1993, **87**: 54~59.
- [16] 张英培. 一些组织的分子标记系统 [J] . *动物学研究*, 1994, **15**(1): 1~10.
- [17] 刘春宇, 张春玲, 夏家辉. 随机引物在分子生物学研究中的应用 [J] . *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23**(6): 517~520.
- [18] Wang W, Lan H, Su B, *et al*. Random polymorphic DNA analysis of four minority nationalities in Yunnan province [J] . *Chin Sci Bull*, 1994, **39**: 1 900~1 903.
- [19] Hui D W, Zhuang B C, Gu J, *et al*. A preliminary study on systematics of genus Glycine with RAPD [J] . *Chin Sci Bull*, 1994, **39**: 175~178.
- [20] Chen X X, Zhao X Y. Analysis of genetix relationship among lilacs (Syringa) by RAPD [J] . *Acta Hort Sin*, 1995, **22**: 171~175.
- [21] 乔爱民, 刘佩瑛, 雷建军. 芥菜 16 个变种的 RAPD 研究 [J] . *植物学报*, 1998, **40**(10): 915~921.

Molecular classification of seven species of mangroves in Jiulongjiang Estuary in Fujian

ZHOU Han-tao, LIN Peng, ZHENG Wen-zhu, SUN Sheng,
ZHENG Zhi-qiang, LIN Fan, CHEN Lu-zhen
(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: DNAs from 7 species of mangroves were extracted by the CTAB method. The A_{260}/A_{230} value of DNA solutions ranged from 1.6 to 2.0. RAPD analyses on genetic diversity of mangroves were conducted. 9 effective primers were screened from 30 arbitrary primers and 352 DNA bands were amplified. Based on UPGMA cluster analysis on DNA bands amplified by 9 primers, a DNA molecular dendrogram was established. Compared to the conventional classification, the molecular classification of mangroves was accurate.

Key words: mangroves; RAPD; molecular classification

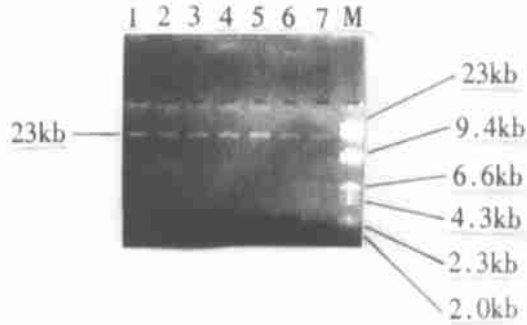


图1 7种红树植物 DNA 电泳检测图谱

Fig.1 DNA electrophoresis examination of 7 mangrove species

1~7 依次为:白骨壤、桐花树、无瓣海桑、秋茄、木榄、海莲、尖瓣海莲; M 为 λ DNA/Hind III 分子量标记

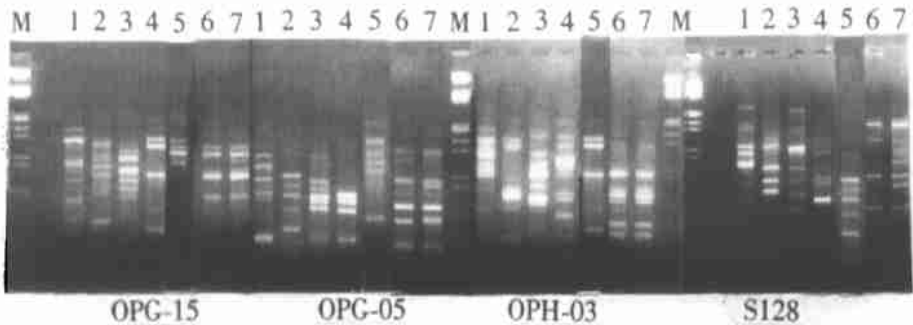


图2 7种红树植物 DNA 指纹图谱

Fig.2 Genomic DNA fingerprints of 7 mangrove species

1~7 依次为:白骨壤、桐花树、无瓣海桑、秋茄、木榄、海莲、尖瓣海莲; M 为 λ DNA EcoR I/Hind III 分子量标记