

福建九龙江口红树植物分子分类的研究^{*}

周涵韬 林 鹏 孙 晟

(厦门大学生命科学学院 361005)

提要 运用 RAPD 技术对福建九龙江口龙海红树林自然保护区浮宫种苗园内白骨壤 (*Avicennia marina*)、桐花树 (*Aegiceras corniculatum*)、无瓣海桑 (*Sonneratia apetala*)、秋茄 (*Kandelia candel*)、木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*)、海莲 (*B. sexangula*)、尖瓣海莲 (*B. sexangula* var. *rhynchopetala*) 等 7 种红树植物进行了遗传多样性分析。从 30 个 10mer 随机引物中筛选出 15 个有效引物, 利用这 15 个有效引物共扩增出 630 条 DNA 带, 其中多态性条带 535 条, 占总扩增条带的 84.92%。利用 Nei 指数法得出 7 种红树植物间的遗传一致度和遗传距离, 并运用 UPGA 统计分析法对红树植物的 7 个种间的亲缘关系进行聚类分析。7 个种分为 A、B 两个大组。白骨壤、桐花树、无瓣海桑同属于 A 组。秋茄、木榄、海莲、尖瓣海莲分子聚类在 B 组。分子聚类结果和传统的分类学相吻合, 由此表明这 15 个有效引物的 RAPD 分子标记技术能较为客观地反应出红树植物种间的遗传亲缘关系, 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

目前国内外对红树植物开展了大量的研究工作, 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, 细胞学观察等进行研究^[2], 目前红树植物某些种的分类关系仍不确定。自 1990 年 Williams 和 Welsh 建立随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术以来, 该技术已广泛用于种质资源分析, 品种鉴定, 遗传连锁图谱构建, 基因定位等领域。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 (*B. sexangula*)、尖瓣海莲 (*B. sexangula* var. *rhynchopetala*), 均采自福建省九龙江口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 (表 1) 为 Operon 公司及上海 Sangon 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 仪器

PCR 仪: PE 公司, 480 型; 紫外分光光度计: 752 型; 电泳仪: BIO-RAD 公司, Power 300 型。凝胶成像系统: UVP 公司, GDS 8000。

1.2 方法

1.2.1 红树植物 DNA 的提取及检测

采用 CTAB 法。

1.2.2 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 UPGA (Unweighted pair group average) 统计软件对所得数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 红树植物 DNA 提取结果

* 国家教育部高等学校博士点基金资助项目 1999038410 号。

收稿日期: 2000-09-26 修回日期: 2001-01-20

表 1 实验中所用随机引物及其序列

Tab. 1 Sequence of arbitrary primers used in the present study

引物号	序列	引物号	序列
OPG05	CTGAGACGGA	S48	GTGTGCCCA
OPG08	TCACGTCCAC	S58	GAGAGCCAAC
OPG15	ACTGGGACTC	S68	TGGACCGGTG
OPG18	GGCTCATGTG	S78	TGAGTGGGTG
OPH01	GGTCGGAGAA	S88	TCACGTCCAC
OPH03	AGACGTCCAC	S98	GGCTCATGTG
OPH11	CTTCCGCAGT	S108	GAAACACCCC
OPH19	CTGACCAGCC	S118	GAATCGGCCA
OPA02	TGCCGAGCTG	S128	GGGATATCGG
OPA08	GTGACGTAGG	S138	TTCCCGGGTT
OPA19	CAAACGTCCG	S148	TCACCAACGGT
S08	GTCCACACGG	S168	TTTGCCCGGT
S18	CCACAGCAGT	S178	TGCCCAGCCT
S28	GTGACGTAGG	S188	TTCAGGTGG
S38	AGGTGACCGT	S198	CTGGCGAACT

7种红树植物 DNA 提取溶液的紫外吸收测定值 A_{260} 和 A_{280} 见表 2,琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。

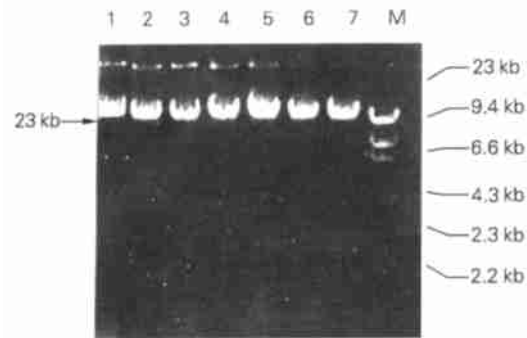


图 1 7种红树植物 DNA 电泳检测图谱

1. 白骨壤 2. 桐花树 3. 无瓣海桑 4. 秋茄 5. 木榄 6. 海莲 7. 尖瓣海莲, M 为 λ DNA/Hind III 分子量标记

Fig. 1 DNA electrophoresis examination of 7 mangrove species

1. *Avicennia marina*, 2. *Agaveas corniculatum*, 3. *Sonneratia apetala*, 4. *Kandelia candel*, 5. *Bruquier agymorrhiza*, 6. *B. sexangula*, 7. *B. sexangula* var. *rhynchopetala*. M: λ DNA/Hind III

由表 2 结果可见, 7 种红树植物的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.6~1.8 之间, 表明 DNA 纯度较好, 没有杂蛋白质、糖类、脂类、RNA 等的污染。由图 1 可知, DNA 的片段大小均一, 长度为 23 kb。所获得的 DNA 可作为 RAPD 反应的模板。

表 2 7 种红树植物 DNA 提取结果

Tab. 2 Results of the DNA extraction of 7 mangroves

种名	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	得率 (μ g/g, FG)
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 7 种红树植物 RAPD 扩增结果分析

从 30 个 10 核苷酸随机引物中筛选出 15 个有效引物。PCR 扩增的电泳图谱见图 2。由图 2 可知各引物在上述每种红树植物中扩增的条带数为 5~8 条, 扩增片段的大小在 0.35~3.5 kb 之间。15 个有效引物扩增的条带重复性好 (重复 2 次以上), 带型清晰, 便于统

表 3 15 个有效引物在福建浮宫 7 种红树植物中 PCR 扩增情况

Tab. 3 Amplification of 15 effective primers on 7 species of mangroves in Fujian

引物号	序列	扩增条带	多态性条带	多态性条带占百分比 (%)
OPG05	CTGAGACGGA	49	42	85.71
OPG15	ACTGGGACTC	43	39	90.70
OPH01	GGTCGGAGAA	35	30	85.71
OPH19	CTGACCAAGCC	51	48	94.11
OPA02	TGCCGAGCTG	54	46	85.19
OPA19	CAAACGTCCG	49	44	89.80
S08	GTCCACACGG	38	32	84.21
S58	GAGAGCCAAC	43	37	86.05
S68	TGGACCGGTG	38	30	78.95
S78	TGAGTGGGTG	36	30	83.33
S88	TCACGTCCAC	39	32	82.05
S168	TTTGCCCGGT	42	36	85.71
S178	TGCCCAGCCT	41	35	85.37
S188	TTCAGGTGG	36	28	77.78
S198	CTGGCGAACT	36	26	72.22
总计		630	535	
平均		42	35.67	84.93

计分析。同时对 DNA 带型进行统计, 结果见表 3。

由表 3 可知, 这 15 个有效引物共扩增出 630 条 DNA 带, 平均每个引物在这 7 种红树植物中扩增出 42 条带。多态性条带 535 平均每个引物有 35.67。多态性条带占总扩增条带的 84.93%。

2.3 7 种红树植物遗传一致性及遗传距离聚类分析

运用 Nei 指数法首先得到的是 7 种红树植物间

的遗传距离和遗传一致度矩阵(表 4)。遗传距离越大, 遗传一致度越小, 其种间的亲缘关系也就越远。在表 4 的基础上利用 UPGA 统计软件对 15 个有效引物在 7 种红树植物 DNA 中扩增产生的共 630 条 DNA 带进行分析, 进而作出 7 个种的 DNA 分子分类系统图(图 3)。

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。由表 3 可知, 白骨壤与桐花树的遗传距离为 0.58 而与无瓣海桑的遗传距离为 0.6, 无瓣海桑与桐花树的遗传距离达 0.67。可见这 3 种红树植物虽然在同一组, 但由于彼此之间的遗传距离较远 (平均 $0.63 > 0.6$), 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、尖瓣海莲一起出现在 B 组, 它们的平均遗传距离为 0.42, 属于科内属、种间关系。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, 出现在同一亚

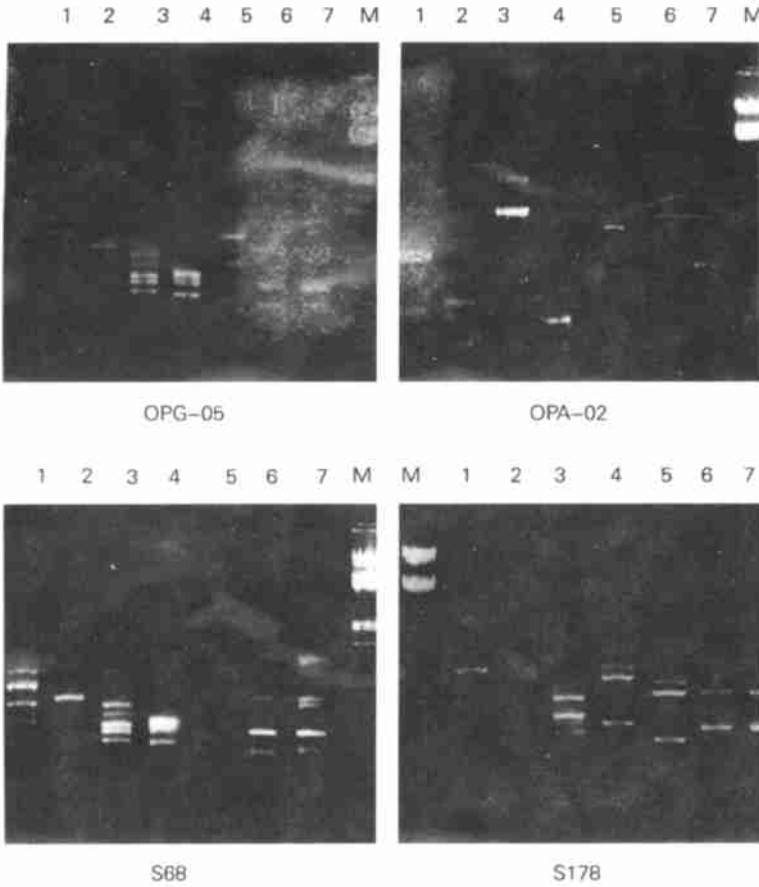


图 2 红树植物 DNA 指纹图谱

1. 白骨壤; 2. 桐花树; 3. 无瓣海桑; 4. 秋茄; 5. 木榄; 6. 海莲; 7. 尖瓣海莲, M 为 λ DNA EcoR I / Hind III 分子量标记

Fig. 2 Genomic DNA fingerprints of 7 species in mangroves

1. *Avicennia marina*, 2. *Aegiceras corniculatum*, 3. *Sonneratia apetala*, 4. *Kandelia candel*, 5. *Bruguiera gymnorhiza*, 6. *B. sexangula*, 7. *B. sexangula* var. *rhynchoptala*, M: λ DNA EcoR I / Hind III

表 4 浮宫 7 种红树植物的遗传距离(下三角)及遗传一致度(上三角)

Tab. 4 Similarity matrix and genetic distance of 7 species of mangroves in Fugong based on Nei's estimate of similarity and genetic distance

种名	白骨壤	桐花树	无瓣海桑	秋茄	木榄	海莲	尖瓣海莲
	<i>Avicennia marina</i>	<i>Aegiceras corniculatum</i>	<i>Sonneratia apetala</i>	<i>Kandelia candel</i>	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	<i>B. sexangula</i>	<i>B. sexangula</i> var. <i>rhynchoptala</i>
白骨壤	0	0.42	0.4	0.22	0.33	0.35	0.41
桐花树	0.58	0	0.33	0.31	0.17	0.17	0.14
无瓣海桑	0.6	0.67	0	0.13	0.19	0.09	0.14
秋茄	0.78	0.69	0.87	0	0.62	0.61	0.52
木榄	0.67	0.83	0.81	0.38	0	0.7	0.64
海莲	0.65	0.83	0.91	0.39	0.3	0	0.82
尖瓣海莲	0.59	0.84	0.86	0.48	0.34	0.18	0

组,平均遗传距离为 0.27,属于属内种间关系。这和传统的分类学相吻合。

3 讨论

本研究运用 RAPD 技术对不同种属的红树植物进行遗传亲缘关系研究时,引物的筛选有一定的原则。以宏观分类上非常明确的 7 种红树植物(分属不同的科、属)为标准,用 30 种 10 核苷酸随机引物逐一筛选逐一统计,并用 UPGA 法逐一分析,凡是能和宏观分类相统一的引物,即为适合于红树植物分子分类的引物,最后获得 15 种有效引物。这也说明这 15 个有效引物所扩增的红树植物 DNA 区域其变化随植物的遗传进化,而有一定的变化规律,能反应植物种间的遗传关系^[3]。

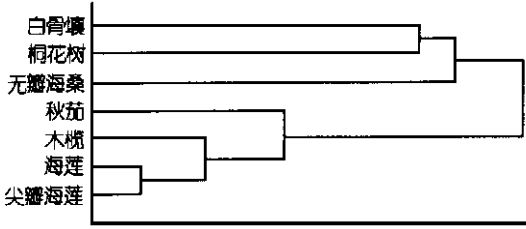


图 3 7 种红树植物的分子分类系统

Fig. 3 DNA molecular dendrogram of 7 mangrove species

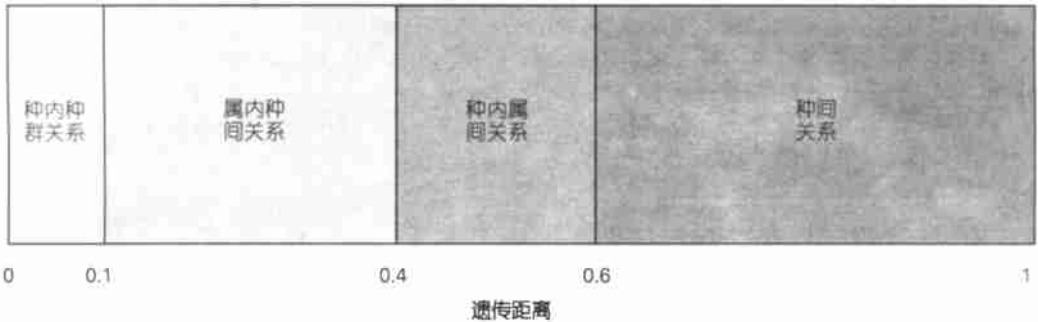


图 4 红树植物遗传距离划分关系

Fig. 4 Delimit of genetic distance in mangroves

遗传变异是进化的动力,而进化过程必然伴随着或大或小的遗传变异,这是物种形成的第一步。一般的规律是,随着分类或进化水平的提高,分类群间遗传一致度下降,遗传距离加大。Gotlieb 对 28 种植物的亲缘关系用等位酶进行了研究,发现种内种群间遗传距离较低,平均值 < 0.1 。种间遗传距离明显升高,平均值在 $0.4 \sim 0.1$ 之间(图 4)。在本研究中,作者选取 7 种红树植物,它们中有属内种间关系,科内属间关系,并且分类关系较为明确可作为标准。通过前面的分析,得出如下结论:(1)运用 RAPD 分子标记技术,对不同种属的红树植物进行遗传分类,其结果与传统宏观分类结果相一致,因而准确可信;(2)获得红树植物不同科、属、种间的遗传距离划分关系。结果见图 3,图 4。由图 4 可知,当红树植物种间遗传距离在

$0 \sim 0.1$ 之间时,表明它们很可能是同一个种的不同种群的关系;遗传距离在 $0.1 \sim 0.4$ 之间时,表明它们很可能是同一个属的不同种的关系;遗传距离在 $0.4 \sim 0.6$ 之间时,表明它们很可能是同一个科的不同属的关系;遗传距离在 > 0.6 时,表明它们很可能是不同科之间的关系;当然,这一分析结果并不是绝对的,也可能有些例外情况存在,还需在今后的研究中进一步加以验证。但在我们所研究的这些红树植物的遗传分类关系上,基本满足以上规律。

主要参考文献

- 1 林 鹏. 中国红树林生态系. 北京: 科学出版社, 1997. 1~
- 2 林 鹏. 红树林. 北京: 海洋出版社, 1984. 1~
- 3 朱玉贤. 现代分子生物学. 北京: 高等教育出版社, 1997. 170~ 232

MOLECULAR PHYLOGENY OF SEVEN SPECIES OF MANGROVES IN JIULONG RIVER IN FUJIAN

ZHOU Han-tao LIN Peng SUN Sheng
(School of Life Sciences, Xiamen University 361005)

Received: Sep. 26 2000

Key Words: Mangroves, RAPD, Molecular classification

Abstract

DNAs from 7 species of mangroves were extracted by the CTAB method. A $260/A_{280}$ value of DNA solutions ranged from 1.6 to 2.0 and the length of DNA fragment was about 23 kb. RAPD analyses on genetic diversity of mangroves were conducted. 15 effective primers were screened from 30 10-oligonucleotide arbitrary primers, and a total of 630 DNA bands were amplified, among which 535 (84.92%) were polymorphic. Based on UPGA cluster analysis on DNA bands amplified by the 15 primers, a DNA molecular dendrogram was established. A standard delimit of genetic distance in mangroves was also established, and compared to the conventional classification, the molecular classification of mangroves was accurate. All results from the analyses of molecular phylogeny could be valuable to the projects of plant introduction, ecological restoration and conservation in mangroves. (本文编辑: 张培新)

金藻中 EPA 的分离与分析


李 润¹ 张秀荣¹ 张万宽¹ 许振国²

(¹ 清华大学化学系 北京 100084)

(² 山东荣成鸿洋神集团 威海 264321)

提要 为建立金藻 *Isochrysis galbana* 中 EPA 的分离与分析方法, 对金藻中的脂肪酸进行萃取分离和乙酯化, 硅胶薄板检验乙酯化程度, 利用气相色谱 (GC) 进行定性分析, 用内标法对 EPA 进行定量分析。测得藻粉中 EPA 含量为 1.92%。

关键词 金藻, EPA, 分离, 气相色谱

 EPA 的传统来源是鱼油, 但鱼油数量有限, 从鱼油中纯化 EPA 有一定难度, 且具有难以去除的鱼腥味。因此, 寻找 EPA 的新来源受到关注^[1-3]。近年来, 人们发现某些海洋微藻中含有较多 EPA, 作者用气相色谱仪 (GC) 对金藻 *Isochrysis galbana* 中脂肪酸进行分析, 并对 EPA 的含量进行了测定。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

金藻由清华大学生物系培养。

氯仿、甲醇、无水乙醇、正庚烷、氢氧化钠、乙酸乙酯均为分析纯, 北京化工厂出品。

石油醚 (60~90 °C), 分析纯, 中国人民解放军第九零六六工厂。

BF3 乙醚溶液, 分析纯, 北京八零九厂。

EPA 乙酯, 99.6%, 中国药品生物制品检定所。

C₁₈ 脂肪酸乙酯, 99%, SIGMA 公司。

HP6890 plus 气相色谱仪。

收稿日期: 2000-11-03 修回日期: 2001-04-05