

木榄属 3 种红树植物的遗传变异和亲缘关系分析

潘文^{1,2}, 周涵韬^{1,3}, 陈攀¹, 林鹏^{1,2}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 湿地与生态工程研究中心, 福建 厦门 3361005; 3. 福建省农业科学院 生物技术中心, 福建 福州 350003)

摘要: 用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 和 inter-简单重复序列 (ISSR) 分子标记技术对木榄属 (*Bruguiera*) 3 种红树木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*)、海莲 (*B. sexangula*)、尖瓣海莲 (*B. sexangula* var. *rhynchopetala*) 进行遗传亲缘关系研究。12 个 RAPD 引物和 10 个 ISSR 引物分别扩增出 240 和 191 条带, 多态位点百分率分别为 38.75% 和 52.88%, ISSR 检测到的多态位点率高于 RAPD。运用 Nei 指数法计算木榄-海莲、木榄-尖瓣海莲、海莲-尖瓣海莲之间的遗传距离, RAPD 分析结果为 0.47、0.36、0.29, ISSR 分析结果为 0.62、0.41、0.32。同时运用 UPGMA 统计法进行聚类分析, 结果显示, 海莲和尖瓣海莲聚为一组, 木榄单独一组。结合宏观形态和等位酶资料, 作者把尖瓣海莲确定为海莲的变种。

关键词: 木榄属; ISSR; RAPD; 分子标记

中图分类号: Q37

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)05-0023-06

DNA 序列多态性的检测和利用是分子生物学最主要的进展之一^[1]。目前, 已发展了多种以 DNA 多态性为基础的遗传标记, 其中 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)^[2] 和 ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)^[3] 标记, 在生物种属鉴定、种质资源的遗传多样性、基因定位、分子连锁图构建^[4-7] 等方面得到了迅速而广泛地运用。相对于组织蛋白和等位酶分析而言, RAPD 和 ISSR 具有多态性高、无需活材料, 能实现全基因组无偏取样和无组织器官特异等优点; 与卫星分析相比, 二者不要求预知基因组序列信息, 大大减少了多态性分析的预备工作。

红树林是分布于热带海岸潮间带的木本植物群落, 是热带海岸重要的植被类型, 是维护海岸生态平衡的特殊生态系。由于不合理的开发利用, 全世界的红树林都面临着资源枯竭的严重境地, 为保护和可持续利用这一独特资源, 各有关国家开展了许多研究。但研究多集中在生理学、生态学、生物化学^[8] 等领域, 而分子生物学的研究较少。与其他生物保护一样, 用分子标记的方法研究红树植物遗传多样性是红树植物种质资源保护及开发利用的基础。目前, 红树植物某些种属的分类关系仍不确定。红树植物中红树科木榄属的植物在中国共有 4 种^[9]: 柱果木榄、木榄、海莲、尖瓣海莲。柱果木榄在海南有记录, 现已灭绝。木

榄在我国分布较广, 海莲、尖瓣海莲均分布在海南岛。3 种红树植物在形态学上的差异较小, 主要集中在花器的结构上, 这给引种、造林研究造成一定困难。通常, 证实种间关系主要依靠形态学、次生化合物、染色体、地理分布和实验杂交等方法, 但这些方法都有其局限性。相比之下, 分子标记技术是一种有效的分析手段, 对于任何一个类群来说, 要么含有某个基因位点, 要么不含该位点, 不存在形态性状中难以判断的中间性状。作者利用 RAPD 和 ISSR 两种 DNA 分子标记技术对木榄属 3 种红树植物木榄、海莲、尖瓣海莲的进行遗传亲缘关系研究。

1 材料和方法

1.1 材料

木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*)、海莲 (*B. sexangula*)、尖瓣海莲 (*B. sexangula* var. *rhynchopetala*) 均采集于海

收稿日期: 2004-02-10; 修回日期: 2004-10-12

基金项目: 教育部科技重点项目 (104105); 福建省青年科技项目 (2001J033)

作者简介: 潘文 (1967-), 女, 福建人, 博士生, 研究方向为分子生态学, E-mail: pcpanwen@citiz.net; 周涵韬, 通讯作者, E-mail: htzhou@jingxian.xmu.edu.cn

南岛东寨港红树林保护区内。选择生长良好, 无病虫害, 胸径 4 cm 以上的母树。每隔 5~10 m 随机选取一株, 每个种取 5 个个体, 采集幼嫩叶片单独做好标记。叶片采集后置于 -20℃ 冰箱或液氮储存备用。

RAPD 和 ISSR 引物, 以及 Taq 酶等药品均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 方法

1.2.1 红树植物 DNA 的提取

参照周涵韬^[8]等方法进行总 DNA 的提取。

1.2.2 RAPD-PCR 反应

从 100 个 RAPD 随机引物 (上海生工) 中筛选出 12 个能获得清晰多态性条带, 反应稳定引物。RAPD-PCR 扩增总体积为 25 μ L。包括 Tris-HCl 10.0 mmol/L (pH8.0), KCl 50.0 mmol/L, 0.1% Tritonx-100, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L dNTPs, 0.4 μ mol/L 引物, 80 ng 的 DNA 模板, 1Utaq 聚合酶。PCR 循环设置为: 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 40 个循环, 然后 72℃ 延伸 7 min。反应产物在含有 EB 的 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 电压为 5 V/cm, 2 h, 电泳结束后, 在紫外检测仪上观察, 并在凝胶成像系统保存图像。

1.2.3 ISSR-PCR 反应

按照与 RAPD 相同的筛选策略从 30 个 ISSR 引物中选出 10 个用于 ISSR 的 PCR 反应。ISSR-PCR 扩增总体积为 20 μ L。包括 Tris-HCl 10.0 mmol/L (pH8.0), KCl 50.0 mmol/L, 0.1% Tritonx-100, 2 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.4 μ mol/L 引物, 80 ng 的 DNA 模板, 1Utaq 聚合酶, 无菌水 6.6 μ L。PCR 循环设置为: 94℃ 变性 5 min 后, 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 45 个循环, 然后 72℃ 延伸 7 min。反应产物在含有 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 电压为 5 V/cm, 2 h 记录和拍照同 RAPD。

1.2.4 数据统计分析

在 RAPD 和 ISSR 扩增结果电泳图谱中, 有带计为“1”, 无带计为“0”, 强带和弱带均计为“1”。

遗传一致度、遗传距离及聚类分析: 根据 RAPD 扩增结果所统计的数据, 遗传距离 (D) 和遗传一致度 (F) 的计算运用 Nei 指数法^[10], $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 N_{xy} 为两个个体共同享有的 RAPD 标记数, N_x , N_y 分别为 X 和 Y 个体分别拥有的 RAPD 标记数, 再经 $D = 1 - F$ 计算相应的遗传距离。聚类分析采用 UPGMA (unweighted pair group mean average) 进行^[11]。

2 结果与分析

2.1 RAPD 分析结果

在运用 RAPD 引物对 3 个供试材料的 DNA 扩增过程中。需对模板 DNA 的浓度做梯度实验。模板浓度在 50~150 ng 时都有扩增, 最后选定为 80 ng/ μ L。在 PCR 扩增中, 酶是最主要的影响因素, 由于不同厂家不同批次酶的活性不同, 对镁离子浓度要求不同, 因此, 每次买新酶必须做镁离子梯度实验, 以确定最佳镁离子浓度。本实验最后选定镁离子浓度为 2.5 mmol/L。

从 100 个 RAPD 引物中筛选出 12 个能获得清晰条带, 反应稳定的引物 (重复 2~3 次) 进行研究。引物号序列以及 RAPD 扩增情况见表 1。RAPD 反应扩增片段大部分集中在 0.35~3.5 kb 范围内, 如图 1。12 个 RAPD 引物在木榄属 3 种红树植物中共扩增出 290 条带, 平均每个引物扩增出 20 条带, 其中具有多态性的扩增带有 93 条, 占总扩增带的 38.75%, 平均每个引物可扩增出 7.75 条多态性带。

根据 RAPD 扩增结果, 运用 Nei 指数法计算木榄属 3 种红树植物的遗传距离和遗传一致度, 结果见表 2。木榄-海莲, 木榄-尖瓣海莲, 海莲-尖瓣海莲的遗传距离分别为 0.47、0.34、0.29。平均遗传距离为 0.36。并运用 UPGMA 统计分析对木榄属 3 种植物的亲缘关系进行聚类分析, 结果见图 2。木榄与海莲、尖瓣海莲的亲缘关系较远单独聚为一组, 海莲与尖瓣海莲的关系较近。两者聚为一组。

表 1 木榄属 3 种红树植物 RAPD-PCR 扩增情况

Tab.1 Amplification of 3 mangrove species of *Bruguiera* by RAPD-PCR

引物号	引物序列	扩增条带	多态条带	多态百分率 (%)
S124	GGTGATCAGG	13	4	30.77
S125	CCGAATTCCC	17	14	82.35
S129	CCAAGCTTCC	29	14	48.28
S130	GGAAGCTTGG	26	8	30.77
S141	CCCAAGGTCC	25	4	16
S143	CCAGATGCAC	26	11	42.31
S144	GTGACATGCC	22	7	31.82
S148	TCACCACGGT	14	8	57.14
S149	CTTACCCGA	18	6	33.33
S152	TTATCGCCCC	16	4	25
S155	ACGCACAACC	21	9	42.86
S156	GGTGACTGTG	13	4	30.77
平均		240	93	
总计		20	7.75	38.75

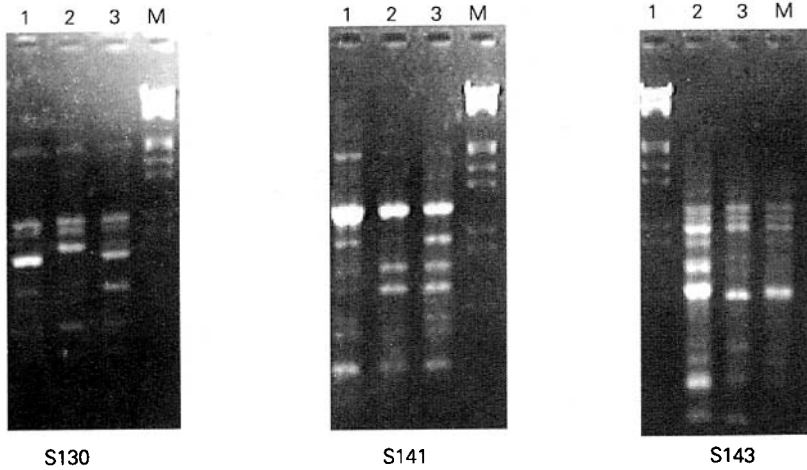


图1 木榄属3种红树植物 RAPD 引物扩增图谱

Fig.1 genomic DNA fingerprints of 3 mangrove species in *Bruguiera* by RAPD

1. 木榄; 2. 海莲; 3. 尖瓣海莲, M为 λ DNA EcoR I /Hind III 分子量标记

1. *Bruguiera gymnorhiza*; 2. *B. sexangula*; 3. *B. sexangula var. rhynchopetala*, M: λ DNA EcoR I /Hind III

表2 木榄属3种红树植物 RAPD 分析的遗传距离(对角线下)及遗传一致度(对角线上)

Tab.2 Similarity matrix and genetic distance of 3 species of mangrove in *Bruguiera* by RAPD

木 榄	海 莲	尖瓣海莲
0	0.53	0.66
0.47	0	0.71
0.34	0.29	0

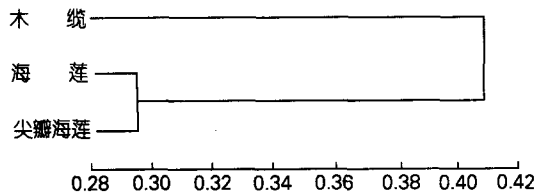


图2 木榄属3种红树植物分子分类系统(RAPD分析)

Fig.2 DNA molecular dendrogram of 3 mangrove species in *Bruguiera* by RAPD

2.2 ISSR 分析结果

在 RAPD 体系的基础上, 发现 ISSR 体系模板 DNA 的浓度与 RAPD 差别不大, 同时也对镁离子进行梯度实验, 以获得最适合酶活性的镁离子浓度。实验结果以 Taq 酶用量 1 U, 镁离子浓度为 2 mmol/L,

从 30 个 ISSR 引物中筛选出 10 个扩增效果好的

引物进行遗传差异研究(表 3)。ISSR 反应扩增片段大部分集中在 0.2~2.0 kb 范围内, 如图 3。10 个 ISSR 引物在木榄属 3 种红树植物中共扩增出 191 条带, 平均每个引物扩增出 19.1 条, 多态性条带有 101 条, 占总扩增带的 52.88%。平均每个引物可扩增出 10.1 条多态性带, ISSR1 引物扩增多态性条带百分率最高达 85%。运用 Nei 指数法, 根据 ISSR 扩增结果, 计算木榄属 3 种红树植物的遗传距离和遗传一致度(表 4), 木

表3 木榄属3种红树植物 ISSR-PCR 扩增情况

Tab.3 Amplification of 3 mangrove species of *Bruguiera* by ISSR-PCR

引物号	引物序列	扩增条带	多态性条带	多态性条带百分率(%)
ISSR1	GC(AC) ₄	20	17	85
ISSR2	CCC(GT) ₆	18	9	50
ISSR3	CGC(GA) ₆	19	7	36.84
ISSR4	CCA(GTG) ₄	7	1	14.29
ISSR5	GCG(AC) ₆ A	29	14	48.27
ISSR6	(AG) ₈ T	28	16	57.14
ISSR7	(GA) ₈ T	18	9	50
ISSR8	(GA) ₈ GC	21	9	42.86
ISSR9	(AC) ₈ CA	23	14	60.87
ISSR10	(CT) ₈ AC	8	5	62.5
总计		191	101	
平均		19.1	10.1	52.88

榄-海莲、木榄-尖瓣海莲、海莲-尖瓣海莲的遗传距离分别为0.62、0.42、0.31,平均值为0.45。运用UPGMA 统计分析对木榄3种红树植物的亲缘关系进

行聚类分析,结果见图4。木榄与海莲、尖瓣海莲的亲缘关系较远单独聚为一组,海莲与尖瓣海莲的关系较近,两者聚为一组。

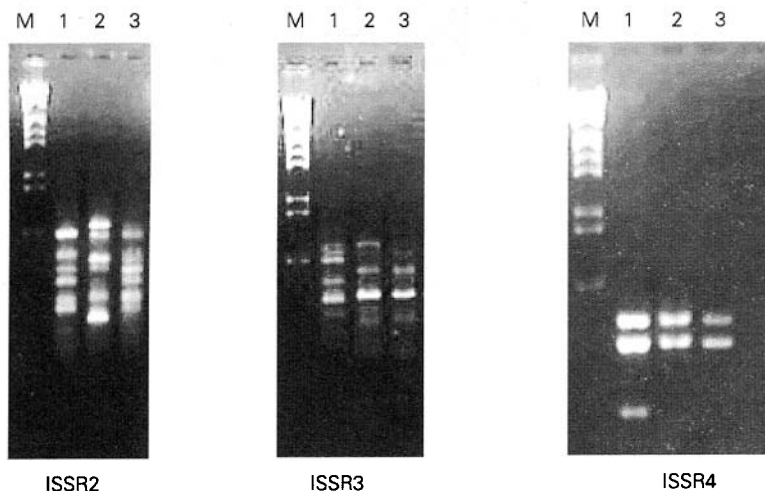


图3 木榄属3种红树植物ISSR引物扩增图谱

Fig.3 genomic DNA fingerprints of 3 mangrove species in *Bruguiera* by ISSR

1. 木榄;2. 海莲;3. 尖瓣海莲, M为λDNA EcoR I /Hind III 分子量标记

1. *Bruguiera gymnorhiza*; 2. *B. sexangula*; 3. *B. sexangula var. rhynchopetala*, M:λDNA EcoR I /Hind III

表4 木榄属3种红树植物ISSR分析的遗传距离(下三角)及遗传一致度(上三角)

Tab.4 Similarity matrix and genetic distance of 3 species of mangrove in *Bruguiera* by ISSR

	木 榄	海 莲	尖瓣海莲
木 榄	0	0.38	0.59
海 莲	0.62	0	0.68
尖瓣海莲	0.41	0.32	0

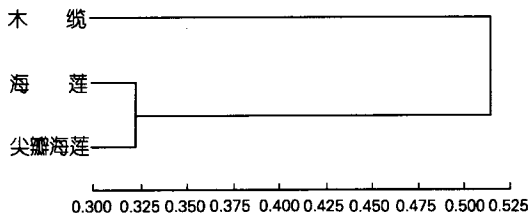


图4 木榄属3种红树植物分子分类系统(ISSR分析)

Fig.4 DNA molecular dendrogram of 3 mangrove species in *Bruguiera* by ISSR

3 讨论

多态位点百分率是衡量物种遗传变异水平高低的一个重要指标,是度量遗传多样性的重要参数。

Hamrick 等^[12]用等位酶对449种植物进行遗传变异研究,首次在种水平上对植物的遗传多样性做出估计,并且在种群水平上的遗传多样性做了对比,揭示出种多态位点平均水平为50.5%,种群多态位点平均水平为34.2%。本研究用RAPD方法检测木榄属3种红树植物的平均多态百分率为38.75%,低于449个种的平均水平,高于种群平均水平。ISSR方法检测的平均多态百分率为52.88%。说明ISSR比RAPD检测到更多的遗传多态位点。显然,这与它们在对基因组进行扩增时引物结合位点的不同有直接的关系。在小麦和水稻的研究中也证明ISSR检测遗传多态性的能力比RAPD更高^[5,13]。RAPD和ISSR分析所获得的遗传距离和UPGMA聚类树状图结果均比较一致。说明这两种分子标记技术可以有效地应用于象红树植物这类遗传多态性低物种的个体鉴定和遗传多样性评价研究。

遗传变异是进化的动力,而进化过程必然伴随或大或小的遗传变异,这是新物种形成的关键一步^[14]。一般来说,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。Gottlieb^[15]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

间遗传距离很低,平均值为 0.05。种间遗传距离明显升高,平均值为 0.33。在本研究中,RAPD 和 ISSR 方法所获得木榄、海莲、尖瓣海莲平均的遗传距离分别为 0.36 和 0.45。表明 3 种红树植物为属内种间关系。从分子聚类图上,海莲、尖瓣海莲聚为一组,而木榄单独聚为一组,表明海莲与尖瓣海莲亲缘关系较近,二者与木榄的亲缘关系较远。电泳图谱上,尖瓣海莲与海莲的指纹图谱极为相似,而与木榄的指纹图谱差异较大。林鹏^[9]对中国红树植物的形态学分类描述中,木榄与海莲、尖瓣海莲在形态有较大的差别,而海莲与尖瓣海莲仅存在极小差异(表 5),但这些差异都不是辨别种的主要特征,因此,把尖瓣海莲定位海莲的变种。葛菁萍^[16]用等位酶方法对木榄属 3 种红树植物进

行了种间亲缘关系分析,共检测了 5 个酶系统,7 个酶位点和 17 个等位基因,结果表明,木榄-海莲的遗传一致度为 0.796 6,海莲-尖瓣海莲的遗传一致度为 0.915 0,尖瓣海莲-木榄的遗传一致度为 0.889 5,表明海莲与尖瓣海莲之间的亲缘关系要近于木榄,尖瓣海莲是海莲的变种。综合上述研究,作者认为把尖瓣海莲处理为海莲的一个变种似乎更为妥当。

作者用 RAPD 和 ISSR 两种分子标记有效地将亲缘关系接近的尖瓣海莲和海莲区分开来。可看出分子分类对于红树资源的鉴定、分类及遗传多样性评价是一种有效手段。它应用于红树植物的分子分类研究是可行的。分子分类技术结合传统的分类方法必将进一步促进红树资源的合理开发、保护和利用。

表 5 木榄属三种植物的形态学差异

Tab.5 Morphologic variance of 3 species in *Bruguiera*

项目	海 莲	尖瓣海莲	木 榄
1. 花萼裂片	9~12 枚,通常 10 枚	9~12 枚,通常 10 枚	10~14 枚,通常 12 枚
2. 花萼/萼管	结果时长于萼管	结果时长于萼管	结果时短于萼管
3. 花萼管	有纵棱	有纵棱	平滑
4. 花瓣	边缘被粗毛	边缘被粗毛	基部被密毛,上部秃净
5. 花瓣裂片	裂片顶端具刺毛 1~2 条, 裂口 1 条 1. 刺毛:1 条 2. 花药:不具喙	裂片顶端具刺毛 1~2 条 裂口 1 条 2 条 具喙	顶端锐具刺毛 2~4 条,裂口 1 条 明显超出花瓣顶端

参考文献:

[1] 阎文昭,蔡平钟,宣 朴,等. RAPD 技术在生物学研究中的应用[J]. 世界科技研究与发展,1999,2:83-84.

[2] Williams J G L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nuc Aci Res*, 1990, 18(22):6 531-6 535.

[3] Ziekiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomica*, 1994, 20: 176-183.

[4] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传,2002,24(5):613-615.

[5] 杜金昆,姚颖娟,倪中福,等. 普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回小麦选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究[J]. 遗传学报,2002,29(5):44-48.

[6] 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.

[7] Penner G A, Chong J, Levesque L M, et al. Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene Pg3[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 702-705.

[8] 周涵韬,林 鹏. 中国红树科 7 种红树遗传多样性分析[J]. 水生生物学报,2001,25(4):362-369.

[9] 林 鹏. 红树林[M]. 北京:海洋出版社,1984.

[10] Nei M, Li W. A mathematical model for studying genetic variation in the terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 17:5 269-5 273.

[11] Vierling R A, Nguyen H T. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 835-838.

[12] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [A]. Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. eds. Plant population genetics, breeding, and genetic resources[C].

- Sunderland Mass: Sinauer, 1989. 43 - 46.
- [13] 钱伟, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性 [J]. 植物学报, 2000, 42 (7): 741 - 750.
- [14] Grant V. Plant speciation [M]. New York: Columbia University Press, 1981. 149 - 172.
- [15] Gottlieb L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 1977, 64: 161 - 180.
- [16] 葛菁萍. 几种红树植物遗传变异和生态分化的研究 [D]. 厦门大学博士论文, 1999.

Genetic variation and relationship of 3 *Bruguiera* species by RAPD and ISSR

PAN Wen^{1,2}, ZHOU Han-tao^{1,3}, CHEN Pan¹, LIN Peng^{1,2}

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Research Centre for Wetlands and Ecological Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Biotechnology Centre, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350003, China)

Received: Feb., 10, 2004

Key word: *Bruguiera*; RAPD; ISSR; molecular marker

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) methods were applied to detect genetic variation and relationship of 3 mangrove species of *Bruguiera* (*Bruguiera gymnorhiza*, *B. sexangula*, *B. sexangula* var. *rhynchoptetala*). 12 RAPD and 10 ISSR primers generated 240 and 191 bands, of which 91 and 101 were polymorphic, respectively. Percentages of polymorphic bands of RAPD and ISSR were 38.75% and 52.88%. Comparison of the two marker systems shows that ISSR was better than RAPD in terms of reproducibility and ability of detecting genetic polymorphism. It was found that the average genetic distance among different 3 mangrove species of *Bruguiera* by RAPD and ISSR were 0.37 and 0.45, respectively. Based on UPGMA cluster analysis, it showed that *Bruguiera sexangula* and *B. sexangula* var. *rhynchoptetala* were classified into same group, while *Bruguiera gymnorhiza* in an other group. Comparing with the results of morphology and allozyme by other reports, *B. sexangula* var. *rhynchoptetala* could be regarded as a variety of *Bruguiera sexangula*.

(本文编辑:张培新)