

文章编号: 1001-411X(2002)02-0054-04

华南三地观光木遗传多样性的 RAPD 分析

黄久香, 庄雪影

(华南农业大学林学院, 广东 广州 510642)

摘要: 报道了广东南昆山和始兴都亨、广西靖西三地的观光木 *Tsoongiodendron odorum* 居群基因多态性研究的初步结果. 应用随机扩增多态 DNA(RAPD) 分子标记方法, 从 108 个 10 个碱基的随机引物中获得了 18 个多态性标记. 在 3 个居群共 42 个样株中, 共检测到 78 个位点, 其中多态位点 66 个, 占 84.62%, 显示该物种的基因多样性较高. 聚类分析结果表明, 样品可分为 3 个居群; 广东境内的 2 个居群间相似性较高, 相似性系数达 0.832, 广西与广东都亨和南昆山 2 个居群间的相似性较低, 相似性系数分别为 0.772 和 0.768. 南昆山居群内的基因多样性最高, 广东始兴都亨居群的基因多样性最低, 广西居群居中.

关键词: 观光木; 自然居群; 遗传多样性; 随机扩增多态 DNA 分析
中图分类号: Q346.5 文献标识码: A

观光木 *Tsoongiodendron odorum* 是我国特有的木兰科植物. 观光木天然分布于湖南、江西南部、华南至海南, 以南岭山地为中心, 该种分布区虽广, 但种群较小而为稀有植物, 是我国二级保护植物^[1]. 该植物在形态上与含笑属 *Michelia* 相近, 但其聚合果于果熟时愈合而与后者不同, 是研究被子植物系统发育方面的重要材料, 同时它树形优美, 花色素雅而芳香, 具有较高的观赏价值. 木兰科植物是华南热带亚热带常绿阔叶林的重要区系成分, 但由于大面积天然林的破坏和人类的过度利用, 许多木兰科植物的自然种群已处于濒危状态. 保护木兰科植物种质资源, 抢救珍稀濒危种类已引起了国内外的广泛重视. 近年来, 有关木兰科植物系统发育、分子生物学及细胞学方面的研究进展很快^[2~5]. 在遗传多样性方面, 国内外研究较多的种类是鹅掌楸属 *Liriodendron*^[4,5],

但目前尚未见到有关观光木自然居群间遗传多样性的研究报道. 本文是应用 RAPD 的分子标记技术, 研究广东南昆山、始兴都亨和广西靖西观光木等 3 个居群的基因多态性及相似性的初步研究结果, 拟为进一步开展观光木资源保护和遗传多样性提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料来源

检测材料为 2000 年 5 月至 8 月, 分别采自广东省龙门县南昆山、始兴县都亨和广西靖西县观光木自然居群, 共采集了 42 个植株的幼叶样品, 3 个样品采集地的自然条件和样品所在地的地理位置、生境及样品数见表 1 所示.

表 1 观光木自然居群 RAPD 分析样品来源

Tab. 1 Habitat of the samples for RAPD

居群 population	地理位置 location	海拔 altitude/m	生境 habitat	个体数(编号) samples(No.)
南昆山 Nankunshan	23°37'N, 114°38'E	550	沟谷次生林	22 (No. 1-22)
都亨 Duheng	24°41'N, 114°10'E	310	沟谷次生林	9 (No. 34-42)
靖西 Jingxi	22°54'N, 106°40'E	550	沟谷人工林	11 (No. 23-33)

1.2 总 DNA 提取和浓度测定

总 DNA 提取方法是在高盐低 pH 值法^[6]的基础上稍作改进. DNA 浓度用琼脂糖比色法与标准浓度的 λDNA 比较确定.

1.3 引物筛选

首先用 3 个 DNA 样品对 108 个 10 个碱基的 RAPD 引物作筛选, 然而选取出扩增谱带清晰, 且重

复性好的引物作为本研究样品的基因多态性检测之用.

1.4 PCR 扩增

RAPD 扩增在 PCR-9700 基因扩增仪上进行. RAPD 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 然后进入 40 个循环: 94 °C, 40 s; 38 °C, 1 min; 72 °C, 1 min. 循环完成后, 于 72 °C 延伸 10 min. 最后于 4 °C 保存. 反应体系

收稿日期: 2001-03-05

作者简介: 黄久香(1975-), 女, 现为华南农业大学在读硕士研究生.

基金项目: 香港嘉道理暨植物园生物多样性奖学金(G00003)

($V=25 \mu\text{L}$) 组成如下: 20 ng 左右的模板 DNA, 5 pmol/L 引物, dNTPs 的量各为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 2.5 μL 反应缓冲液[100 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCl(pH 8.3), 500 $\mu\text{mol/L}$ KCl, 15 mmol/L MgCl₂, φ 为 0.01% 明胶, 5.0 g/L BAS], 1 U [在 37 °C 适当的体积、适当的 pH 值、离子强度, 以 1 μg DNA (λ DNA) 被完全酶解所消耗的酶量为 1 个单位, 以 U 表示] *Taq* 酶. 扩增产物在 φ 为 1.2% 含溴化乙锭的琼脂糖凝胶中电泳分离, 最后在紫外灯下用凝胶成像系统拍照记录结果.

1.5 扩增产物分析

RAPD 扩增谱带的记录: PAMP 扩增谱带, 显带处记为“1”, 缺失或模糊不清处记为“0”. 多态位点百分率(P)为 RAPD 测定的多态位点占测定位点的百分比.

1.6 数据分析

本研究所用的软件为 NTSYS, 得出相似系数矩

阵和聚类树状图. 居群基因多态性用 Shannon-Wiener 多样性指数(H)表示: $H = -\sum P_i \ln P_i$. P_i 为每一随机引物中基因谱带数占所有引物谱带数之比; 居群相似性用相似性系数(S)表示: $S = 2B / (A + C)$, B 为 2 个居群共有的随机引物中谱带数, A 、 C 分别为居群 A 、 C 在 18 条扩增引物中显示的总谱带数.

2 结果与分析

2.1 RAPD 引物的筛选及 PCR 扩增结果

从 108 条引物中, 共筛选出 18 条重复性好且扩增产物清晰的引物用于 RAPD 分析. 每条寡核苷酸引物可扩增 1~8 个 DNA 片段(图 1, 表 2). 在 18 条引物共检测到 78 个位点, 其中多态性位点 66 个, 占 84.62%. 扩增片段长约 300~3000 bp, 说明观光木的不同居群内蕴藏了丰富的遗传变异, 保持较高的遗传稳定性.

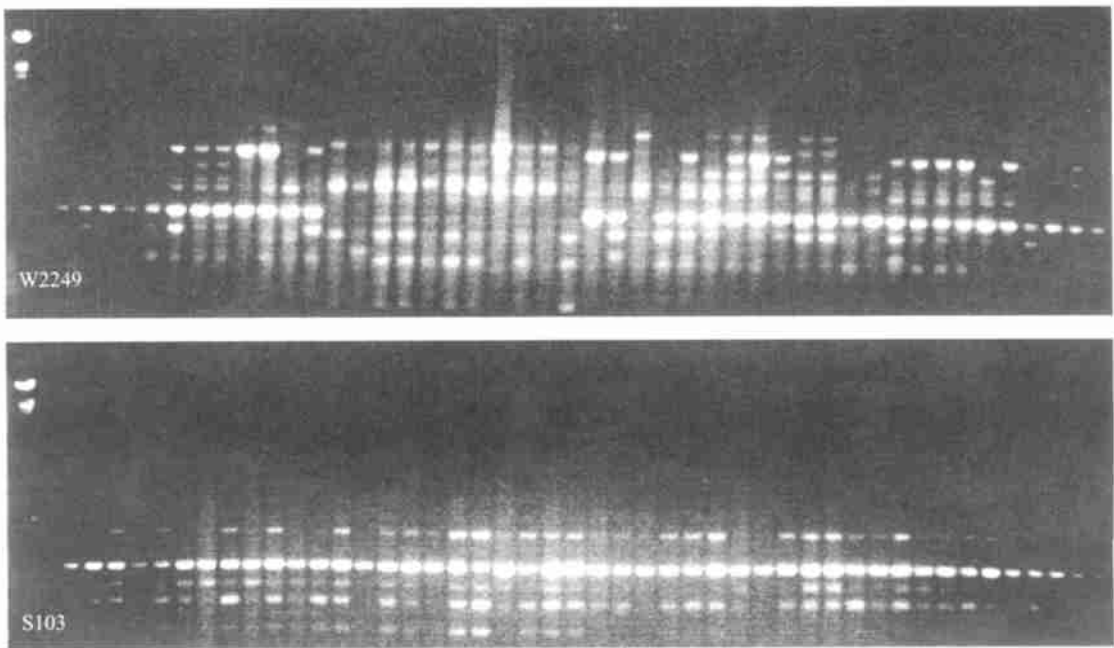


图 1 引物对检测样品的扩增结果(样号从右至左: 1~42 左下方为引物号, 左侧一列为 M; λ DNA/Hind III+ Ecor I)
Fig. 1 PCR results by two primers(No. of the samples from left to right: 1~42 M; λ DNA/Hind III+ Ecor I)

表 2 用于观光木遗传多样性检测的寡核苷酸引物的序列及其检测位点

Tab. 2 Sequence and bands of the primers for PCR analysis

引物号 primer code	位点数 gene bands	引物号 primer code	位点数 gene bands
S91	3	W2245	1
S93	3	W2246	3
S103	8	W2247	7
S104	5	W2248	5
S112	8	W2249	5
S207	6	W2250	1
S215	4	W2252	3
S279	2	W2253	3
W2243	7	W2255	4

2.2 聚类分析

对不同居群样品的 RAPD 谱带进行聚类, 当标记位点数超过 73 个时, 所获得的聚类结果完全一致, 结果见图 2. 检测分析共获得 78 个位点, 42 个样品遗传相似系数在 0.614~0.944 之间, 约 0.645 处可分为 3 个类群: 来源于广东南昆山的 22 个样品的居群分化程度较高, 在遗传距离为 0.700 处聚为一群; 来自广东始兴都亨的 9 个样本和广西靖西的 11 个样本也分别在 0.796 和 0.847 处各自聚为一群.

2.3 观光木居群内的基因多样性

广东南昆山居群的基因多样性最高, 多样性指数为 3.074; 始兴都亨的最低, 多样性指数为 2.195, 广西靖西居群的基因多样性居中, 为 2.389.

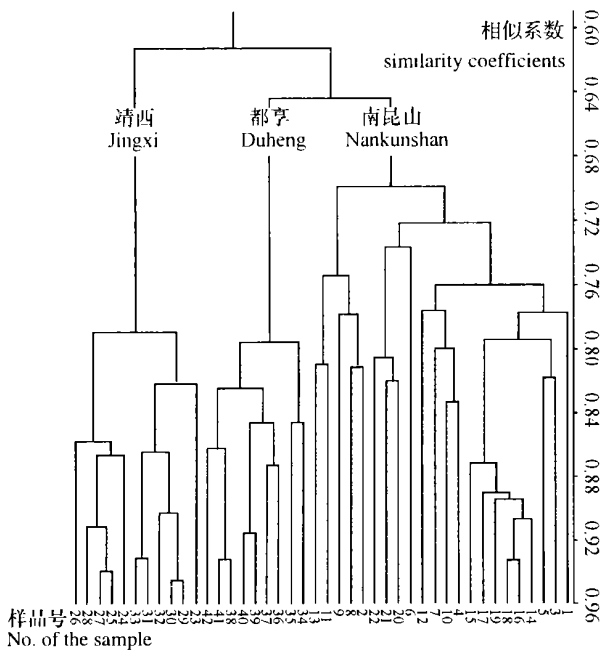


图2 遗传距离聚类分析图

Fig. 2 Genetic distance by cluster analysis

2.4 观光木不同居群间的基因相似性

3个观光木居群相互间的基因相似性分析有差异:广东南昆山、广东始兴都亨2个居群具有较高的基因相似性,其相似性系数为0.832,其次是广东始兴都亨与广西靖西居群,相似性系数为0.772,相似性最低的是广东南昆山与广西靖西居群,相似性系数为0.768.

3 讨论

随着分子生物学技术的迅速发展,群体遗传多样性的研究方法也由过去的形态标记、细胞学标记和生化标记发展到分子标记.其中RAPD遗传标记技术因有简便、快速、易操作等优点,而被广泛应用于林木群体遗传多态性研究^[4,7].

居群内基因多样性结果显示,自然居群结构较好的南昆山居群具有较高的多样性,而自然更新较差的始兴都亨居群和靖西居群的基因多样性均较低.南昆山是广东省内观光木居群较大的区域,居群中包括了多个龄级的植株,居群结构较好,居群结构为稳定型(庄雪影等,待发表).而始兴都亨观光木居群位于河边残林群落,林相受人为破坏严重,居群中主要是成年植株,天然更新不良;靖西的观光木居群的原生群落已受到严重破坏,目前已种上杉树为杉树人工林,现有观光木植株都是人工砍伐后自然萌生起来的,由于生境的破坏,该居群的自然更新也不良,周围未见有幼苗或小树,但与始兴都亨居群相比,靖西居群的基因多样性稍高.

许多学者认为不同生态小环境下可导致不同居群遗传结构的显著差异^[5,7].本研究结果显示,所检测的3个居群均具有较高的基因相似性,但以广东境内的南昆山和车八岭居群间的相似性最高,相似性系数达0.832,广西靖西与广东始兴都亨的相似性次之,靖西与南昆山之间的相似性最低,这可能与群落结构、地理差异有关.

初步研究结果显示,3个观光木居群的总多态位点百分率很高,达84.62%,说明该植物对环境的适应能力较强,这一结果与观光木自然居群分布较广是一致的.研究发现,数量较多的南昆山观光木居群的基因多样性较高,而居群较小的都亨和靖西居群的基因多样性均较低,反映了基因多态性位点与居群大小有着密切的联系,居群数量的减少会导致基因多态性的下降.在野外调查过程中,我们发现华南地区许多观光木居群所在生境都已遭到严重破坏,面临灭绝的威胁.如南昆山具有较丰富的观光木种群,但所在群落并未划入保护区,而位于旅游开发区,由于当地居民没有保护植物的意识,目前人们对观光木群落的干扰越来越严重,观光木居群在急剧减少;始兴都亨的观光木居群位于公路旁的河边,地势比较低平,当地农民也缺乏保护植物的意识,目前正在该群落边缘开荒种果,多株位于林缘的观光木大树已被砍伐,该群落正面临灭顶之灾;靖西的观光木种群早已受到破坏,所在群落已是人工杉树林.因此,生境的破坏是造成现有观光木居群萎缩的主要原因,而居群的萎缩又导致了居群基因多态性的下降.我们认为观光木遗传多态的丧失是该物种濒危的最终结果而不是濒危的起因,保护观光木资源必须从保护森林,保护观光木天然生境开始.根据我们的野外调查,影响观光木自然居群发展的主要原因可能是与其种子缺乏有效传播者和天然群落中种子萌发能力较低有关.许多观光木植株可每年结果,种子寿命短,许多果实悬挂在树上就失去生命力,在林下极少看见该种幼苗.因此,利用人工手段繁殖苗木,营造人工林,将有助于观光木资源的发展.

致谢:本研究在华南农业大学农学院分子标记育种实验室完成,工作中得到了张桂权教授、张泽民教师、刘成明教师和黄少伟教师的热情指导,在此表示衷心的感谢!

参考文献:

- [1] 傅立国,金鉴明.中国植物红皮书——稀有濒危植物:第一册[M].北京:科学出版社,1992.454-455.
- [2] 李秀兰,宋文芹,安祝平等.含笑属核型分析[J].植物分类学报,1998,36(2):145-149.
- [3] 金虹,施苏华,潘恒旭等.含笑亚簇及近缘植物

- maK 基因序列分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 93—97.
- [4] 罗光佐, 施季森, 尹佟明, 等. 利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸种类遗传多样性[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 9—13.
- [5] PARKS C R, WENDEL J F. Molecular divergence between Asian and north American species of *Liriodendron* (Magnoliaceae) with implication for interpretation of fossil floras[J]. Amer J Bot, 1990, 77: 1 243—1 256.
- [6] 邹喻苹, 汪小全, 雷一丁, 等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J]. 植物学报, 1994, 36(7): 528—533.
- [7] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国科学(C 辑), 1996, 26(5): 436—441.

Comparison of Genetic Diversity of *Tsoongiodendron odorum* in Southern China by RAPD Markers

HUANG Jiu-xiang, ZHUANG Xue-ying

(College of Forestry, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The preliminary results on genetic diversity of *Tsoongiodendron odorum* at three sites of southern China were described. Eighteen 10-mer-primers selected from 108 were applied for RAPD analysis. Seventy-eight genes were obtained from 42 leaf samples from the three populations, 66 of them (84.62% of total genes) were polymorphic. The result of cluster analysis showed that the population of Nankunshan of Guangdong province had the highest genetic diversity (3.074), the second was Jingxi of Guangxi province (2.389), the least was Duheng of Guangdong province (2.195). The similarity index between Nankunshan and Duheng in Guangdong province was the highest (0.832), that of Jingxi and Duheng was 0.772, and the similarity index between Jingxi and Nankunshan was 0.768.

Key words: *Tsoongiodendron odorum*; population; genetic diversity; RAPD

【责任编辑 周志红】

(上接第 32 页)

Identification of the Fungal Diseases on *Dracaena fragrans*

XI Ping-gen, QI Pei-kun, JIANG Zi-de

(College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Nine kinds of fungal diseases bark rot, anthracnose, and seven kinds of leaf spots on *Dracaena fragrans* (L.) Ker-Gawl. in Guangzhou region were investigated and identified in 1997 to 2000. The pathogens were *Botryodiplodia theobromae* Pat., *Bartalinia dracaenaea* P.G. Xi, Z.D. Jiang et P.K. Chi, *Curvularia lunata* (Walker) Boedijn, *Curvularia senegalensis* (Speg.) Subram., *Glomerella angulata* (Stonem.) Spauld. et Schrenk, *Pestalotiopsis clavispora* (Atk.) Stey., *Phomopsis dracaenae* Sahni, *Phomopsis dracaenicola* Z.D. Jiang, P.G. Xi et P.K. Chi, *Sphaeropsis dracaenae* P.G. Xi et P.K. Chi. Two severe diseases in the plantations of *Dracaena fragrans* were bark rot caused by *B. theobromae* and anthracnose caused by *G. cingulata*.

Key words: *Dracaena fragrans*; fungal diseases; pathogen identification

【责任编辑 周志红】