

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0098-101

陆均松不同居群的 RAPD 分析^{*}

苏应娟¹, 王 艇¹, 黄 超², 朱建明¹, 周 勤¹

(¹中山大学生命科学学院, 广州 510275; ²湖北中医学院中药系)

摘 要: 采用 RAPD 技术分析了海南吊罗山产陆均松 9 个个体的遗传多样性. 10 个引物共检测了 69 个位点, 其中多态位点 23, 占 33.30%. 陆均松的个体间遗传距离平均值为 0.106 1, 与罗汉松相比, 陆均松的遗传多样性丰富, 推测过度砍伐是造成陆均松渐危的原因.

关键词: 陆均松, 不同居群, RAPD 分析

分类号: Q 949.662, Q 7 **文献标识码:** A

陆均松属 (*Dacrydium*) 是罗汉松科 (Podocarpaceae) 的一个重要属, 约 20 个种, 分布于热带地区, 多产南半球. 我国仅有陆均松 (*D. pierrei*) 1 种, 产海南省五指山、吊罗山、尖峰岭等中低山上部海拔 500~1 600 m 地带, 是常绿季雨林中的主要森林树种^[1].

RAPD 技术提供了简便、快速分析生物体遗传多样性的途径. 现已逐渐发展成为解决属或属下水平动植物的分类、进化和遗传多样性问题的有力工具. 本文通过对分布在海南省吊罗山的陆均松进行遗传多样性的 RAPD 分析, 以期为进一步保护利用陆均松提供进化分子遗传学依据.

1 材料与方法

1.1 材 料

陆均松 (*D. pierrei*) 各个体均采自海南省吊罗山中, 编号为 01~09, 采摘地海拔高度分别为 650, 750, 500, 730, 1 300, 1 250, 530, 1 000 和 1 200 m.

1.2 主要试剂

10 mer 寡核苷酸随机引物购自 Operon 公司 (C 组、G 组、E 组). RAPD 试剂盒购自北京通康生物技术有限责任公司. 相对分子质量标记购自中山大学生物工程研究中心真核分子生物学实验室. 其余均为国产 AR 级试剂.

1.3 DNA 的提取与浓度、纯度检测

取 0.5 g 植物新鲜叶片, 在液氮中迅速研磨成粉末, 分装于 4 个 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 每管加 1 mL -20℃ 丙酮轻轻振荡 1 min. 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 重复一

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (39500013, 39700117); 广东省自然科学基金 (950099, 970176)

收稿日期: 1998-10-15 第一作者简介: 苏应娟, 女, 33 岁, 副教授

次. 每管加入 60 °C 预热 CTAB 提取液 1 mL, 充分混匀, 60 °C 保温 4 h. 500 μ L 氯仿 : 异戊醇 (φ (氯仿) : φ (异戊醇) = 24 : 1) 抽提 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 重复一次. 取水相, 加入 2/3 体积冷异丙醇, 轻轻混合, 可见絮状沉淀, 2 000 ~ 3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液取沉淀. 每管加入 800 μ L 清洗液, 室温下作用 20 min, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 自然凉干. 用 70 μ L TE 溶解. w 为 1.0% 琼脂糖凝胶 (加溴乙锭至 0.5 μ g/mL), 100 V 稳压电泳, 紫外灯下观察照相. 752 型分光光度计上, 波长 260 和 280 nm 处测定吸光度值 (A), 根据 A_{260}/A_{280} 比值判断 DNA 样品的纯度, 由 A_{260} 的值估算浓度.

1.4 RAPD 分析

扩增反应在 ERICOMP 公司 PCR 仪上进行. 反应体积 25 μ L, 包括 H₂O 16.5 μ L, PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTP 1 μ L, 引物 1 μ L, 模板 2 μ L (50 ~ 160 μ g), Taq 酶 2 μ L (2.5×10^{-8} mol/s), 反应混合物用 20 μ L 石蜡油覆盖. 扩增条件: 95 °C 预变性 200 s; 94 °C 变性 1 min, 36 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min. 每次扩增反应均设置不含 DNA 模板的空白对照. RAPD 产物经 ρ 为 1.4% 琼脂糖凝胶电泳 (加溴乙锭至 0.5 μ g/mL) 分离, 于紫外灯下观察照相.

1.5 数据处理

任意 2 个样本间的遗传距离 (D), $D = 1 - F$, $F = 2N_{XY}/(N_X + N_Y)$. 其中, N_X 、 N_Y 分别是样本 X 和样本 Y 扩增出的 DNA 片段总数, N_{XY} 是样本 X 和样本 Y 共有的 DNA 片段数. 根据遗传距离采用 UPGMA 法进行聚类分析, 构建树系图.

2 结果与讨论

2.1 陆均松总 DNA 的提取

裸子植物由于其叶片中富含酚类、萜类、多糖类化合物和一些特殊成分, 按照常规的 DNA 提取方法就很难制备到符合实验要求的 DNA 样品. CTAB (十六烷基三乙基溴化铵) 法是 80 年代后期建立起来, 现已被普遍采用的植物总 DNA 提取方法. 但是在用该法提取陆均松属植物 DNA 时没有得到满意结果. 在用异丙醇或乙醇沉淀 DNA 时总是伴有大量粘性物质析出, 这类物质不仅干扰 DNA 的溶解, 而且在电泳时能阻滞 DNA 使其无法走出点样孔, 这样的 DNA 样品根本无法用于 RAPD 分析. 有报道指出在提取银杉 (*Cathaya argyrophylla*) 和欧洲云杉 (*Picea abies*) 的 DNA 时遇到同样的情况, 提出对于有些物种, 特别是裸子植物, CTAB 法是失败的^[1]. 另外, 采用 Edwards 等^[3] 的方法及高盐低 pH 法^[2] 也未能制备到理想的陆均松植物 DNA.

而用液氮将陆均松植物研磨成粉后, 先用丙酮对粉末进行抽提, 可以有效地去除粘性物质对 DNA 提取的干扰, 随后再用 CTAB 法提取 DNA 可获得满意结果. DNA 清晰成带, 对应于 23 千碱基对片段附近. 每 g 新鲜叶片可提取到 DNA 123 μ g. 作 RAPD 分析时, 一次扩增反应所需的 DNA 模板用量仅为 25 ~ 100 ng. 所以采用本方法制备 DNA 样品只需 mg 级的植物材料即可满足 RAPD 分析的需要. 对于一些珍稀物种或只能提供很少实验材料的物种, 此方法尤其显得有价值.

2.2 陆均松植物 DNA 的 RAPD 分析

对 Operon 公司的 3 组 60 个引物 (C1-20, G1-20, E1-20) 进行筛选, 其中 10 个引物 (表 2) 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳能得到分离良好并呈多态性的带型 (图 1).



图 1 随机引物 C-06 (a), E-11 (b) 的扩增产物
Fig. 1 Amplification products of primer C-06 (a), E-11 (b)
1~9 陆均松; 10 2 kb marker

表 2 引物名称、碱基序列和扩增后每个样品产生的带型数
Tab. 2 Name of primers, sequence and number of bands generated from each individual after amplification

名 称	序 列	植物材料									总计
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'	2	4	4	3	5	3	4	6	3	7
OPE-12	5'-TTATCGCCCC-3'	3	5	4	6	8	9	4	6	7	8
OPG-06	5'-GTGCCTAACC-3'	5	5	5	6	5	5	5	4	2	8
OPE-17	5'-CTACTGCCGT-3'	4	3	4	5	3	4	3	1	2	7
OPE-11	5'-GAGTCTGAGG-3'	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8
OPE-14	5'-TCCGGCTGAC-3'	6	7	6	7	6	6	6	6	6	7
OPE-16	5'-GGTGACTGTG-3'	6	7	7	7	6	6	7	7	6	7
OPC-08	5'-TGCACCGGTG-3'	5	6	5	6	5	5	5	5	5	6
OPE-04	5'-GTGACATGCC-3'	5	6	5	6	5	6	5	5	5	6
OPE-07	5'-AGATGCAGCC-3'	4	4	4	5	4	5	4	4	5	5

该 10 个引物的 $w(G+C)$ 为 60%~70%，每个引物扩增的 DNA 片段数为 1~9 个，10 个引物共检测 69 个位点，其中多态位点 23 个，占 33.30%。这些 DNA 片段的分子容量范围在 278~2 423 碱基对之间。选择清晰而且重复性好的谱带作为分子数据进一步分析。

根据任意 2 个样本 RAPD 图谱中共有的 DNA 片段数和扩增出的 DNA 片段总数，求出它们之间的遗传距离(表 3)。应用 UPGMA 法对遗传距离进行聚类分析得到树系图(图 2)。

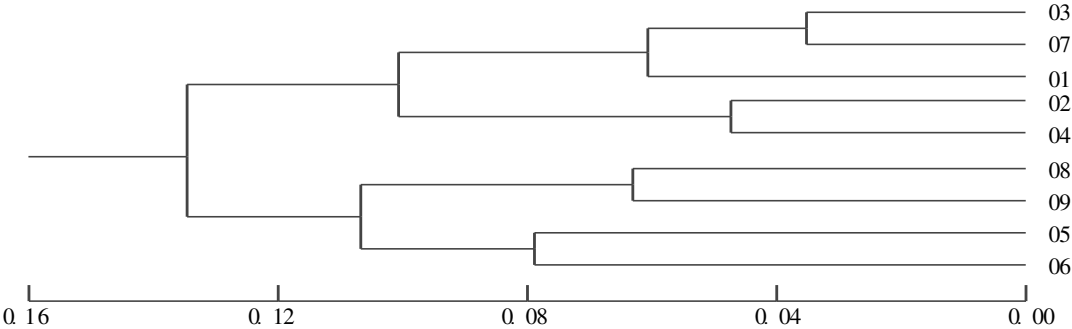


图 2 根据 RAPD 数据，应用 UPGMA 法构建的陆均松个体遗传树系图

Tab. 2 Genetic dendrogram of individuals of *D. pierrei* generated using UPGMA algorithm to cluster RAPD data

表 3 任意 2 个个体间的遗传距离，RAPD 图谱中共有的片段数和扩增片段总数
Tab 3 Genetic distance between any two individuals (above diagonal), the numbers of the shared fragments and the total numbers of fragments amplified in RAPD patterns (below diagonal)

	01	02	03	04	05	06	07	08	09
01		0.109	0.052	0.143	0.149	0.118	0.072	0.131	0.125
02	45/101		0.058	0.054	0.130	0.120	0.077	0.113	0.243
03	46/97	49/104		0.093	0.135	0.124	0.040	0.098	0.131
04	45/105	53/112	49/108		0.125	0.097	0.130	0.164	0.178
05	43/101	47/108	45/104	49/112		0.083	0.115	0.113	0.107
06	45/102	48/109	46/105	51/113	50/109		0.124	0.140	0.096
07	45/97	48/104	48/100	47/108	46/104	46/105		0.059	0.131
08	43/99	47/106	46/102	46/110	47/106	46/107	48/102		0.069
09	42/96	39/103	43/99	44/107	46/103	47/104	43/99	47/101	

图 2 可得，9 个陆均松个体可分为 2 大群，第 1 群包括 03，07，01，02，04 等 5 个个体，可划分为 2 个亚群；第 2 群可划分为 2 个亚群，包括 08，09，05，06 等 4 个个体。这可能与陆均松的生境有关系，来自不同海拔高度的陆均松个体遗传 (P^{14}) 差异较大，这表明陆均松个体存在着地理上的遗传分化。目前对不同地理分布的陆均松尚未见形态学等方面的报道。陆均松的 P 为 0.106 1，罗汉松的 P 为 0.069 3，比陆均松小得多。罗汉松为非濒危种，陆均松是渐危种^[5]。相对罗汉松而言，陆均松的遗传多样性丰富。因此推测其渐危原因不是由于本身遗传特性造成的，可能是过度砍伐导致的。

参考文献：

[1] 郑万均，傅立国. 中国植物志. 第七卷. 北京：科学出版社，1978
[2] 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. 植物学报, 1994, 36: 528 ~ 533
[3] EDWARDS K, EDWARDS K, JOHNSTONE C, et al. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research, 1991, 119 (6): 1349
[4] 汪小全，邹喻苹，张大明，等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. 中国科学 (C), 1996, 26 (5): 436 ~ 441
[5] 国家环境保护局，中国科学院植物研究所. 中国植物红皮书——稀有濒危植物 (第 1 册). 北京：科学出版社，1992

RAPD Analysis of Different Population of *Dacydium pierrei*

SU Yingjuan^{*}, WANG Ting, HUANG Chao, ZHU Jianming, ZHOU Qin

Abstract: The genetic diversity of 9 individuals of *Dacydium pierrei* from Diaoluo Mountain in Hainan province was investigated by RAPD. 10 primers from 3 Operon Kits (KitC, KitE and KitG) amplified 69 bands, of which 23 are polymorphic ones. The mean value of the genetic distances between the individuals of *D. pierre* is 0.106 1. To compare with *Podocarpus macrophyllus*, the genetic diversity of *D. pierrei* is much richer. It is postulated that over cutting is the main reason to make *D. pierrei* dangerous.
Keywords: *Dacydium pierrei*, different population, RAPD analysis

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>