

短枝木麻黄地理种源遗传多样性的 RAPD 分析

叶功富¹, 罗美娟¹, 林益明², 卢昌义³

(1. 福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012; 2. 厦门大学生命科学学院,

3. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用 RAPD 分子标记对 35 个短枝木麻黄(*Casuarina equisetifolia*)种源的遗传多样性和亲缘关系进行了分析. 15 个随机引物共扩增出了 201 条 DNA 带, 其中 148 条为多态性带, 占 73.63%, 平均每个引物扩增出 9.9 条多态性带. 种源的 Shannon's 多样性指数为 0.435 4, Nei's 基因多样性为 0.288 4, 表明短枝木麻黄种源的遗传多样性水平较高. 35 个种源彼此的遗传距离在 0.088 4~0.753 9 之间, 平均 0.404 5, 经过 UPGMA 聚类分析将 35 个种源划分为 A、B、C、D、E、F 6 个类群, 其中 A 群 5 个种源, B 群 17 个种源, C 群 4 个种源, D 群 2 个种源, E 群 1 个种源, F 群 6 个种源.

关键词: 短枝木麻黄; 种源; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: S 722.7

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)06-0856-05

短枝木麻黄(*Casuarina equisetifolia*)是我国东南沿海防护林的主要造林树种之一, 原产于澳大利亚、东南亚和太平洋地区, 现已广泛引种于热带及亚热带地区^[1]. 短枝木麻黄分布范围广, 生态环境复杂多变, 由于地理、生殖隔离, 长期自然和人工选择的结果, 使木麻黄群体间存在明显的遗传分化. 如何利用木麻黄种源间遗传性状的变异特性, 从中选择出速生、抗逆性强的木麻黄优良种源, 是华南地区海岸林经营中的重要任务. 国内外学者在木麻黄种源数量性状与适应性的差异都做了许多工作, 证实了木麻黄地理种源在形态、生长量、抗性上表现出显著差异^[2~5], 但从分子水平进行木麻黄种源遗传多样性的研究还少见报道^[6].

1990 年建立 RAPD 分子标记技术, 是以基因组 DNA 为模板, 利用 10 核苷酸随机引物进行 PCR 扩增, 从而在 DNA 水平上进行遗传多样性检测, 因而 RAPD 方法具有简便、快速、易行等优点, 近年来广泛应用于植物连锁图谱的构建、基因标记和定位、种质鉴定及分子标记辅助育种, 也用于植物遗传多样性、群体遗传结构和遗传资源管理等方面的研究^[7~13], 具有较高的遗传稳定性和代表性. 本实验应用 RAPD 技术, 对 35 个短枝木麻黄地理种源的遗传多样性和亲缘关系进行研究, 旨在为木麻黄遗传资源的合理利用、保存及遗传改良提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验材料采自福建东山赤山防护林场 11 年生短枝木麻黄种源试验林, 35 个种源种子来自于澳大利亚林木种子中心(SIC)(表 1).

1.2 研究方法

1) 短枝木麻黄总 DNA 的提取

参照周涵韬等^[14]的 CTAB 提取方法, 并根据短枝木麻黄的特点, 在 CTAB 提取液中加入 1%β-巯基乙醇及 10% PVP. 用于正式实验的样品总 DNA 均用 RNA 酶 A 进行纯化. 实验所用药品均购自上海生工.

2) PCR 扩增及产物的检测

参照 Williams 的方法^[15], 将条件优化后确定的反应体系如下: 总体积为 25 μL, 其中 Taq DNA 聚合酶 1 U, 随机引物 0.4 μmol/L, dNTP 100 μmol/L, 10×buffer 100 μmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, 模板 DNA 0.2 μmol/L, 反应在 PE4800 型 PCR 仪上进行.

反应程序如下: 94℃变性 1 min, 37℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 共 40 个循环, 然后 72℃延伸 7 min, 最后在 4℃保存.

PCR 扩增反应结束后, 将扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离, 以 1×TBE 为缓冲液, 3~4 V/cm 电泳 2 h, 经 EB(0.5 ng/mL)染色, 并在凝胶成像仪下观察并保存图像.

3) 数据统计与分析

电泳图谱中的每一条带代表了引物与模板 DNA 互补的一对结合位点, 可记为一个分子标记, 根据分子

收稿日期: 2004-12-17

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2004BA516A-B15), 国家 948 项目(96432), 福建省林木种苗攻关项目资助

作者简介: 叶功富(1966-), 男, 高级工程师.

E-mail: yegongfu@126.com

表 1 材料来源
Tab.1 The origins of the materials

编号	种源号	来源地	编号	种源号	来源地	编号	种源号	来源地
1	18008*	澳大利亚	13	18152	越南	25	18296*	泰国
2	15958*	澳大利亚	14	18122	埃及	26	18297*	泰国
3	18013	印度	15	18125	埃及	27	18298*	泰国
4	18014	印度	16	18134	肯尼亚	28	18299*	泰国
5	18015	印度	17	18137	肯尼亚	29	18348*	马来西亚
6	18118	印度	18	18142	肯尼亚	30	18121*	关岛
7	18119	印度	19	18143	肯尼亚	31	18355	贝宁
8	18120	印度	20	18153*	巴布亚新几内亚	32	18040*	汤加
9	18085	越南	21	18270*	斐济	33	18312*	瓦努阿图
10	18086	越南	22	18271*	斐济	34	18267	中国广东
11	18127	越南	23	18287	斯里兰卡	35	18268	中国海南
12	18128	越南	24	18288	斯里兰卡			

注: * 为原生种源(native provenance), 其余为次生种源(int roduced provenance) .

表 2 15 个有效引物在 35 个木麻黄地理种源中的扩增
Tab.2 Amplification of 15 effective primers on 35 provenances of *Casuarina equisetifolia*

引物	序列	多态性带数	扩增带数	多态性比率 / %	Shannon' s 多样性指数	Nei' s 基因多样性
S22	TGCCGAGCTG	14	19	73. 7	0. 199 4	0. 130 8
S23	AGTCAGCCAC	5	11	45. 5	0. 367 5	0. 248 4
S25	AGGGGTCTTG	13	18	72. 2	0. 489 8	0. 322 8
S26	GGTCCCTGAC	8	12	66. 7	0. 357 6	0. 225 6
S28	GTGACGTAGG	11	13	84. 6	0. 560 3	0. 381 3
S29	GGGTAACGCC	12	17	70. 6	0. 411 1	0. 269 9
S30	GTGATCGCAG	8	11	72. 7	0. 407 9	0. 274 2
S31	CAATCGCCGT	10	11	90. 9	0. 463 7	0. 305 4
S32	T CGGCGATAG	10	16	62. 5	0. 439 9	0. 289 8
S34	TCTGTGCTGG	8	12	66. 7	0. 504 3	0. 331 4
S35	TTCCGAACCC	12	13	92. 3	0. 574 4	0. 390 6
S36	AGCCAGCGAA	5	7	71. 4	0. 365 5	0. 229 4
S37	GACCGCTTGT	9	13	69. 2	0. 470 9	0. 315 7
S38	AGGTGACCGT	10	13	76. 9	0. 437 0	0. 285 1
S39	CAAACGTCGG	13	15	86. 7	0. 520 3	0. 347 0
总计		148	201			
平均		9. 87	13. 4	73. 63	0. 435 4	0. 288 4

量标准对照反应产物在胶上的对应位置, 有带的记为 1, 无带的记为 0, 形成 RAPD 表型数据矩阵.

应用 POPGENE 软件^[16], 计算多态条带比率、Shannon' s 多样性指数、Nei' s 基因多样性、Nei' s 无偏差遗传一致度(genetic identity) 与遗传距离(genet- ic distance), 根据 Nei' s 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析.

2 结果与分析

2.1 种源遗传多样性分析

1) 多态条带比率

从 50 个随机引物中筛选出 15 个有效引物(表 2), 在 35 个短枝木麻黄种源中共扩增出 201 条重复性好、清晰的条带, DN A 片段大小在 200~ 5 000 bp 之

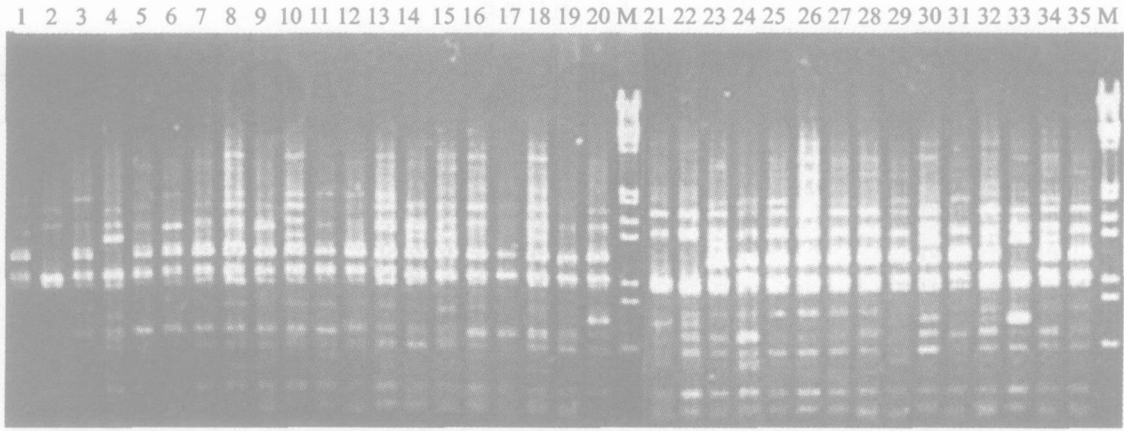


图1 引物 S29 对 35 个短枝木麻黄种源扩增的 RAPD 带型

M 为 DNA λ EcoR I/HindIII 分子量标记

Fig.1 RAPD amplification products generated from primer S29

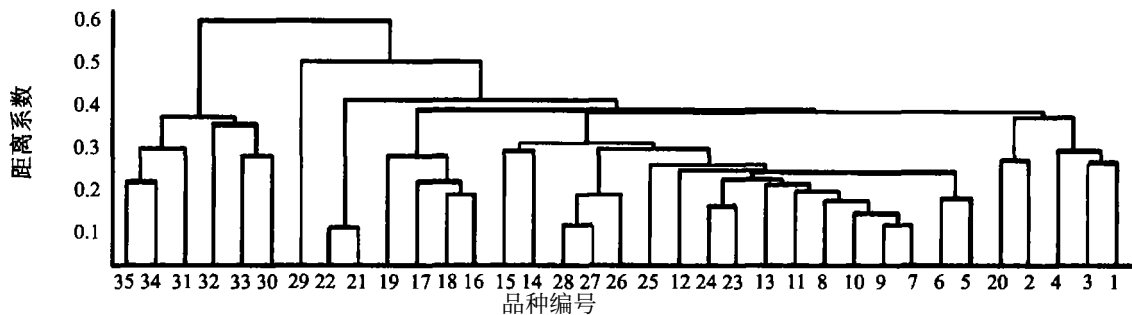


图2 短枝木麻黄种源 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.2 UPGMA dendrogram for 35 provenances of *Casuarina equisetifolia* based on Nei's genetic distance

间,其中多态性条带 148 条,占 73.63%,平均每个引物可获得 9.9 条带.表明短枝木麻黄种源具有丰富的 DNA 序列多态性.引物 S29 对短枝木麻黄 35 个种源的扩增的带型见图 1.

2) Shannon's 多样性指数和 Nei's 基因多样性

Shannon's 多样性指数和 Nei's 基因多样性统计结果见表 2.由表 2 可知,短枝木麻黄种源的 Shannon's 多样性指数平均为 0.435 4,Nei's 基因多样性平均为 0.288 4.不同引物检测到的种源遗传多样性有较大差异,例如引物 S22 检测到 Shannon's 多样性指数和 Nei's 基因多样性分别是 0.199 4、0.130 8,而 S35 分别为 0.574 4、0.390 6.种源根据郭启荣测定,短枝木麻黄正常种群与衰退种群的 Shannon's 多样性指数分别为 0.596 和 0.315,本试验所测得的值介于二者之间.与其他植物相比,巨桉种源 Shannon's 多样性指数平均为 0.237 3^[10],大青杨群体的 Shannon's 多样性指数平均为 0.310^[8].显然,短枝木麻黄具有相当丰富的遗传多样性,这有助于育种策略的制定,也说明可以对种源和单株进行进一步选择,以提高遗传增益.

2.2 聚类分析

遗传一致度和遗传距离是衡量林木种源变异水平的重要指标.35 个种源间的遗传距离最高值为 0.915 4,最低值为 0.470 6,平均距离为 0.404 5,变幅在 0.088 4~0.753 8 之间.根据种源间的遗传距离,通过 UPGMA 聚类分析得到种源间的树状图(图 2),进一步揭示了短枝木麻黄各种源间的亲缘关系.从图 2 可以看出,在 0.35 处,将 35 个种源划分为 A、B、C、D、E、F 6 个类群,其中 A 群 5 个种源(1、3、4、2、20),B 群 17 个种源(5、6、7、9、10、8、11、13、23、24、12、25、26、27、28、14、15),C 群 4 个种源(16、18、17、19),D 群 2 个种源(21、22),E 群 1 个种源(29),F 群 6 个种源(30、33、32、31、34、35).

3 讨论

RAPD 标记因比其它 DNA 标记(如 RFLP)简单、利于进行大量位点的分析,被认为比等位基因能够提供更多的基因组随机样本等,广泛应用于分子生态学研究领域.在评价种群内遗传多样性的参数中,多态位

点比率(P)、Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数是衡量种群遗传变异的几个主要指标. 虽然多态位点比率(P)计算简单直观,但能够反映一定的遗传多样性程度,在研究中得到了广泛的应用. 本研究利用 15 个随机引物共扩增出 201 条重复性好、清晰的 DNA 带,其中多态性条带占 73.63%,平均每个引物可获得 9.9 个位点,种源的 Shannon's 多样性指数平均为 0.435 4,Nei's 基因多样性平均为 0.288 4. 上述 3 个指标显示,短枝木麻黄种源具有丰富的遗传多样性. 分析其原因主要是由于木麻黄分布范围广,区内气候土壤等条件存在巨大差异,在长期自然选择的作用下产生了广泛的遗传变异,形成表型不一,对环境条件要求各异的地理种群,因此,种内具有丰富的遗传多样性. Hamrick^[17]曾指出,具有高水平遗传变异的植物多为寿命长、地理分布广、风媒授粉、杂交种、结实性高的物种,而短枝木麻黄具备了全部这些特征. 这与人运用形态、生长、等位酶技术研究木麻黄的遗传变异所得规律基本一致^[2~4,18,19].

如图 3 所示,短枝木麻黄天然分布广,从马来西亚到澳大利亚北部、美拉尼西亚(Melanesia)、玻利尼西亚(Polynesia)及菲律宾等海岸的广大区域均有原生种群分布^[1]. 作为多用途树种,印度、越南、中国、东西非、加勒比海地区都有大面积引种栽培,引种历史可以追溯到一百年前,其中越南木麻黄栽培面积达 $8.0 \times 10^9 \text{ hm}^2$ ^[20],我国东南沿海地区为 $3.0 \times 10^9 \text{ hm}^2$ ^[21]. 利用 UPGMA 聚类分析得到的树状图体现了不同种源间的亲缘关系. 根据各种源的来源地(表 1),来自印度的次生种源 3、4 与来自澳大利亚和巴布亚新几内亚的原生种源 1、2、20 的亲缘关系较近,归为一类,说明次生种源可能原引自澳大利亚和太平洋地区;来自印度、越南、埃及、斯里兰卡的次生种源 5、6、7、9、10、8、11、13、23、24、12、14、15 与来自泰国的原生种源 25、26、

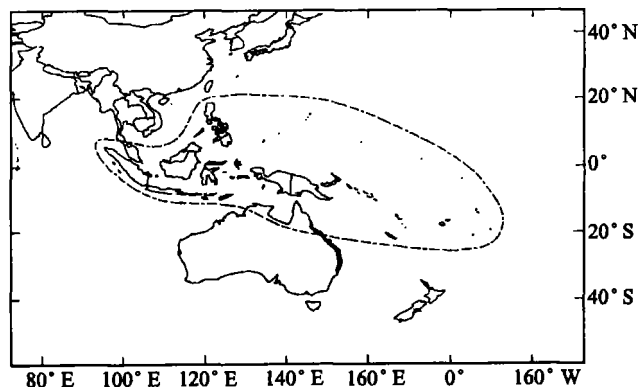


图 3 短枝木麻黄的天然分布(虚线内)^[1]

Fig. 3 Natural distribution of *Casuarina equisetifolia* subsp. *Equisetifolia* (within broken line)

27、28 归为一类,说明这些次生种源可能引自泰国;来自肯尼亚的 16、18、17、19 种源归为一类,来自斐济的 21、22 种源归为一类,种源 30、33、32、31、34、35 也表现出较近的亲缘关系,这反映了来自贝宁、广东和海南的次生种源可能引自关岛、汤加,种源 29 来自马来西亚单独归为一类.

利用 RAPD 技术估测短枝木麻黄地理种源之间的遗传变异及其多样性,种源内较高水平的遗传多样性为其遗传选择和改良奠定了基础.

致谢:本研究得到国家林业局南方山地用材林重点开发实验室和福建省森林培育与林产品加工利用重点实验室的资助.

参考文献:

- [1] Pinyopusarerk K, Williams E R. Range wide provenance variation in growth and morphological characteristics of *Casuarina equisetifolia* grown in Northern Australia[J]. For. Ecol. Manag., 2000(134): 219–232.
- [2] 叶功富,冯泽幸,潘惠忠,等.木麻黄国际种源苗期生长及抗盐性试验[J].福建林学院学报,1995,15(4): 301–306.
- [3] 仲崇禄,施纯淦,王维辉,等.华南地区短枝木麻黄种源试验[J].林业科学研究,2001,14(4): 408–415.
- [4] 何坤益,陈财辉,杨政川.木贼叶木麻黄原生种源之形态系统归类[J].台湾林业科学,2001,16(4): 285–293.
- [5] 黄金水,丁琰,高美玲.51个木麻黄地理种源对星天牛抗虫序列的调查研究[J].福建林业科技,1993,20(3): 29–33.
- [6] 杨政川,邓书麟,陈财辉.应用 ISSR 解析木麻黄种源之遗传变异与种源关系[J].台湾林业科学,2004,19(1): 79–88.
- [7] 尤勇,洪菊生. RAPD 标记在杉木种源遗传变异上的应用[J].林业科学,1998,34(4): 32–38.
- [8] 苏晓华,张绮纹,郑先武,等.利用 RAPD 分析大青杨天然群体的遗传结构[J].林业科学,1997,33(6): 504–512.
- [9] 张宏意,陈月琴,廖文波.南方红豆杉不同居群遗传多样性的 RAPD 研究[J].西北植物学报,2003,23(11): 1994–1997.
- [10] 李志辉,杨模华.巨桉种源遗传多样性的 RAPD 分析[J].中南林学院学报,2003,23(4): 5–9.
- [11] 郭启荣.木麻黄遗传多样性及其物质与能量特征研究(硕士学位论文)[D].厦门:厦门大学,2003.
- [12] Vignir S, Kesara A. DNA fingerprinting of *Populus trichocarpa* clones using RAPD makers[J]. New Forests, 1995,10(3): 197–206.
- [13] Nesbitt K A, Potts B M, Vaillancourt R E, et al. Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus lobules* (Myrtaceae) [J]. Heredity, 1995,74: 628–637.

- [14] 周涵韬, 林鹏. 中国红树科 7 种红树植物遗传多样性分析[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 362– 369.
- [15] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl. Acids Res., 1991, 18: 6 531– 6 535.
- [16] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, et al. POPGENE V 1.31. [EB/OL] <http://www.ualberta.ca/~fyeh>. 1997.
- [17] Hamrick J L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations[A]. In: Urbanska K M. Differentiation Patterns in Higher Plants[C]. New York: Academic Press, 1987. 53– 67.
- [18] 李春蕊. 闽南木麻黄的遗传多样性与分化研究(硕士学位论文)[D]. 厦门: 厦门大学, 1998.
- [19] 葛菁萍, 林鹏. 厦门三种木麻黄属(*Casuarina*)植物的种内遗传变异和种间亲缘关系分析[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2002, 19(4): 110– 114.
- [20] Ha Chu Chu, Le Dinh Kha. Planting and uses of *Casuarina equisetifolia* in Vietnam[A]. Recent Research and Development in Casuarinas. Proceeding of the Third International Casuarina Workshop Held in Danang[C]. Vietnam: CSIRO, Canberra, 1996. 223– 223.
- [21] Zhong Chonglu, Bai Jiayu. Introduction trials of Casuarinas in southern China[A]. Recent Research and Development in Casuarinas. Proceeding of the Third International Casuarina Workshop Held in Danang, Vietnam [C]. CSIRO: Canberra, 1996. 191– 195.

Analysis on Genetic Diversity of *Casuarina equisetifolia* Provenances by RAPD

YE Gong-fu¹, LUO Mei-juan¹, LIN Yi-ming², LU Chang-yi³

(1. Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, 3. College of Oceanography
and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Genetic diversity and phylogenetic relationship of 35 *Casuarina equisetifolia* provenances were studied by RAPD marker. 201 bands were identified with 15 oligonucleotide primers, out of which 145 bands were polymorphic and accounted for 73.63%. The average number of DNA bands amplified by each primer was 9.9. The average Shannon's index of diversity and Nei's gene diversity were 0.435 4 and 0.288 4 respectively. The results showed that there was great genetic diversity within *C. equisetifolia* provenances, which provided base for genetic selection and breeding. The genetic distance among 35 provenances ranged 0.088 4 to 0.753 9 and the average was 0.404 5. Based on UPGMA cluster analysis, 35 provenances were divided into 6 groups: group A, B, C, D, E and F. Group A included 5 provenances, group B included 17 provenances, group C included 4 provenances, group D included 2 provenances, group E included 1 provenances and group F included 17 provenances. They showed close phylogenetic relationship within groups respectively.

Key words: *Casuarina equisetifolia*; provenance; genetic diversity; RAPD