

利用 *rbcL* 基因序列比对分析广西优质红锥种质资源的遗传多样性

王鸣刚¹, 肖岸容¹, 赵宏¹, 李志忠¹, 王蕾², 陈亮²

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 通过 PCR 扩增得到 10 个红锥品系的 *rbcL* 基因全序列, 均为 1.513 kb. 核苷酸序列比对结果表明, 在 256-1455 bp 区间 10 个红锥品系共有 16 处碱基发生变异, 变异率为 1%, 其中在 306 bp 和 634 bp 处 10 个红锥品系较同属对照 *castanopsis lucida* 均发生相同的变异, 可以看作属内进化信息碱基. 对表达的氨基酸序列进行比对分析, 发现 16 处碱基变异共引起 8 处氨基酸序列变异.

关键词: 红锥; 遗传多样性; *rbcL* 基因序列

中图分类号: Q 753

文献标识码: A

文章编号: 1003-4315(2008)06-0106-04

Analysis of genetic variability of *Castanopsis hystrix* by *rbcL* gene sequences

WANG Ming-gang¹, XIAO An-rong¹, ZHAO Hong¹, LI Zhi-zhong¹, WANG Lei², CHEN Liang²

(1. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The *rbcL* gene sequences of 10 assassin of *Castanopsis lucida* were analyzed by PCR, and sixteen mutations in 256-1455 bp were found, the mutation ratio was 1%. Compared to *Castanopsis lucida*, between 306 bp and 634 bp, they had two characteristic mutations of their own, so it was different from *Castanopsis lucida*. Compared to *Castanopsis lucida*, 8 amino acid variations were found, caused by 16 point mutations.

Key words: *Castanopsis hystrix*; genetic variability; *rbcL* gene sequences

红锥 (*Castanopsis hystrix* A. DC.) 别名红栲、红柯, 属壳斗科常绿乔木, 分布于我国广东、广西、云南以及贵州、湖南、江西、福建、海南等省, 包括西藏的墨脱县^[1], 中心分布区在广西南部. 红锥具有生长快、材质优、适应广、效益高等优良特性, 其主干通直、材质坚硬、纹理细致、耐腐蚀性强, 被广泛应用于建

筑、造船、高级家具、体育器材等行业; 种子富含淀粉, 可作饲料、酿酒; 种实、壳斗含单宁, 可制取栲胶; 枝叶浓密, 混生性能好, 萌发力强, 是与松、杉混交造林的最佳伴生树种之一^[2].

叶绿体基因组中的 *rbcL* 基因序列 (长度 1.4 kb) 是分子系统学研究中最为广泛的分子指标之一, 具有以单拷贝形式存在, 不发生基因转变, 能提供较多的分子性状等优点. *rbcL* 基因的保守性极强, 碱基的置换速度非常缓慢, 每百万年只有 0.5~0.6 个碱基发生突变^[4].

对红锥优良品系的遗传多样性进行准确的评价, 可以为亲本选配、后代遗传变异及杂种优势水平的预测提供预见性的指导, 这是关系到育种目标

作者简介: 王鸣刚 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物分子生物学. E-mail: mgwang@163.com

资助基金: 广西林业科学研究院国家林业局中南速生材繁育重点实验室开放基金课题; 兰州理工大学博士基金 (SB08200602); 甘肃省教育厅研究生导师基金 (0703-11).

收稿日期: 2008-03-06

能否成功实现的关键.本试验通过 *rbcl* 序列的对比分析,研究了 10 个优质红锥品系的遗传多样性,旨在为红锥资源合理保护及开发利用,优质红锥的选育以及解释其系统发育提供理论依据,也为红锥 DNA 指纹图谱的构建奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料选用广西林科院试验基地的 10 个优质红锥品系的新鲜叶片,采样后立即放入超低温冰箱备用.其原产地分别为广东高洲县(1)、广西蒲北县(2)、广东信宜县(3)、广西苍梧县(4)、广西容县(5)、广西东兰县(6)、广西凭祥县(7)、广西博白县(8)、广东陆河县(9)、广西南明县(10).

1.2 *rbcl* 引物

根据栲属其他 2 种(*Castanopsis lucida*, *Castanopsis inermis*) *rbcl* 序列对比结果(相似 99%)设计 1 对引物,序列如下:

5 端引物 R1: 5' ATGA GTCGTA GGGAGG GACTT 3'

3 端引物 R2: 5' TTA GTAAAA GATTGGGC CGA G 3'

1.3 基因组 DNA 的提取

每个红锥品系随机选取 15 个个体的混合叶片,采用改进的 CTAB 法^[5]提取总 DNA,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, DNA 的纯度和浓度通过紫外吸收法测定.

1.4 PCR 扩增

分别以 10 个红锥品系总 DNA 为模板,用引物 R1 和 R2 进行 PCR 扩增. PCR 扩增条件: 94 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 52 复性 45 s, 72 延伸 90 s, 30 个循环, 72 延伸 10 min.

1.5 DNA 连接反应

连接反应体系为: pMD-18T 载体片段 0.5 μ L, T₄DNA 连接酶 1 μ L, 10 \times T₄DNA 连接酶缓冲液 1 μ L, PCR 纯化产物 7.5 μ L, 充分混合后 16 连接过夜.

1.6 阳性克隆的筛选

在培养液中挑取白色单克隆菌落,接种于 5 mL LB 培养液中过夜,吸取少量菌液保种,然后用 PCR

或碱裂解法少量提取质粒 DNA 进行 *Bam*H / *Hind* 双酶切鉴定. 阳性克隆命名为 pMD-R1R2.

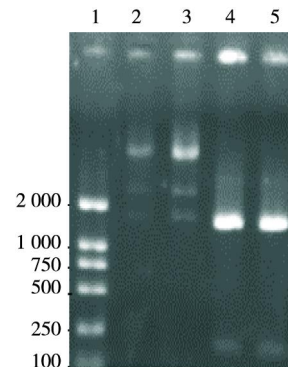
1.7 PCR 产物测序及基因序列分析

阳性单克隆菌液, 40% 甘油保种后, 10 个样品各取 3 个不同的阳性单克隆寄往上海博亚公司测序. 运用 DNAMAN 软件对核苷酸序列进行对比分析.

2 结果与分析

2.1 *rbcl* 基因 PCR 扩增结果及阳性重组子酶切鉴定

PCR 扩增获得的目的片段约 1 500 bp, 测序结果与红锥同属的 *Castanopsis lucida* blast 相似度高达 99%, 表明扩增获得的目的片段为红锥的 *rbcl* 基因. *Bam*H 和 *Hind* 双酶切结果表明目的片段已经插入到克隆载体 pMD-18T 中, 如图 1 所示.



注: 1. DNA 分子质量标准; 2, 3. 酶切产物; 4, 5. PCR 扩增产物.

图 1 PCR 扩增结果及酶切鉴定结果

Fig. 1 Results of PCR and identification of recombination clone pMD-18T

2.2 核苷酸序列

通过 PCR 扩增, 10 个优质红锥品系均得到了 1.531 kb 的完整片段, 核苷酸序列比对结果表明(表 1), 从 256-1 455 bp 区间共有 16 处碱基发生变异, 变异率为 1%, 其中 306 bp 处和 634 bp 处 10 个红锥品系较同属的 *Castanopsis lucida* 均发生相同的变异, 可以看作属内进化信息碱基.

2.3 氨基酸序列

对 10 个优质红锥品系得到的 1.531 kb 片段进行原核表达, 对得到的氨基酸序列进行比对分析, 发现发生变异的 16 处碱基, 共引起 8 处氨基酸序列变异, 结果见表 2.

表1 *rbcL* 基因核苷酸序列对比结果Tab.1 Alignment of nucleotide sequence of *rbcL* gene

碱基位置 / bp	<i>Castanopsis</i>	原产地									
	<i>lucida</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
256	C	C	C	C	C	t	C	C	C	C	C
306	A	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
388	A	A	A	A	A	A	A	g	A	A	A
426	T	T	T	T	T	a	T	a	T	T	T
569	A	A	t	A	A	A	A	A	A	A	A
634	A	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
748	C	C	C	C	C	C	C	t	C	C	C
974	A	A	A	A	A	A	A	g	A	A	A
1 103	G	G	c	G	G	G	G	G	G	G	G
1 218	A	A	A	g	g	A	A	A	A	A	A
1 234	G	a	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1 266	T	T	T	T	T	a	T	T	T	T	T
1 296	A	A	A	A	A	A	g	A	A	A	A
1 362	A	T	T	T	T	T	T	c	T	T	T
1 384	A	A	A	A	A	A	A	c	A	A	A
1 455	T	T	c	T	T	T	T	T	T	T	T

表2 氨基酸序列对比结果

Tab.2 The result of amino acid sequence alignment

碱基位置/ bp	<i>Castanopsis</i>	原产地									
	<i>lucida</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
306	N	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
388	N	N	N	N	N	N	N	d	N	N	N
569	K	K	m	K	K	K	K	K	K	K	K
634	I	l	l	l	l	l	l	l	l	l	l
748	E	E	E	E	E	E	E	g	E	E	E
1 103	G	G	a	G	G	G	G	G	G	G	G
1234	G	r	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1 384	E	E	E	E	E	g	E	E	E	E	E

3 讨论

1) *rbcL* 基因的保守性极强,碱基的置换速度非常缓慢,每百万年只有 0.5~0.6 个碱基发生突变.本文对 10 个红锥品系的 *rbcL* 序列分析表明,从 256-1 455 bp 之间 10 个红锥品系共有 16 处碱基发生突变,突变率为 1%,说明 10 个红锥品系之间的确形成了较大的遗传差异,并且与同属的 *Castanopsis lucida* 形成 2 个碱基差异.

2) 影响林木群体遗传变异和分化的原因有很多,不少学者就此问题已做过探讨.葛颂^[6]指出,林木所处的生境条件、群体的起源和家系结构以及林木群体的交配系统均是影响林木群体遗传变异和分化的因子.王洪新等^[7]则特别强调,影响自然群体遗

传结构唯一肯定起作用的因子是繁育系统.在了解群体遗传结构时还应特别注意物候变异,因为花期变异在某种程度上与限制基因流动的地理隔离一样有效^[8].并不尽然,李力^[9]在研究青岛山茶时发现,虽然居群小,但仍然保持了较高的遗传多样性水平 ($He = 0.320$).林木丰富的变异主要起源于遗传上的修饰,这种修饰与林木的生活史有关,过去的大陆迁移、山脉形成及气候变化将群体隔离并且对现存谱系也有重要影响^[10].因此,要了解林木遗传多样性,不能单纯着眼于某个因子,而是要对诸多因子进行综合评价、全面分析,这样才不会导致太大的偏差^[11].

3) 基因型是遗传和生态 2 个因素长期复杂的相互作用的产物,土壤和地理环境对种内变异起重

要作用^[12]. 广西壮族自治区地处 E 104°29' ~ 112°04', N 20°54' ~ 26°20', 地理差别极大, 南濒北部湾, 北为南岭山地, 西延云贵高原, 全区的地形总趋势是西北向东南倾斜, 有台地、盆地、丘陵、溶岩等, 地形交错分布. 主要气候受太阳强烈辐射和冬夏季风环流的影响. 广西在区域上属云贵高原向东南沿海丘陵过渡地带, 形成了复杂多样的地貌类型, 气候特点为广西北半部属中亚热带气候, 南半部属南亚热带气候, 广西年降雨量差异显著, 在 1 000 ~ 2 800 mm 之间, 太阳年总辐射量达 376 ~ 418 kJ/(cm²·a). 广西特殊的地理形势下红锥形成了其稳定的遗传多样性. 浦北地区位于广西东南, 具有亚热带向热带过渡的海洋季风气候特点, 年平均降雨量 1 649.1 ~ 2 055.7 mm, 较其他地方有显著差异, 降雨量的差异可能影响其遗传性状. 浦北和博白地理位置非常接近, 可能导致二者的遗传距离也较为接近. 容县和凭祥地理位置相差很远, 但是两地区的土质相似, 气候相似, 年均温度一致, 同为 22.1 °C, 可能造成二者的遗传距离极为接近. 关于导致这 10 个优质红锥品系产生遗传多样性的其它原因还需要进一步研究.

参考文献

- [1] 黄永权, 梁东成, 张方秋. 广东省红锥遗传改良进展及改良策略初探[J]. 广东林业科技, 2004, 20(4): 58-60
- [2] 朱积余, 蒋 焱, 丘小军. 广西红锥地理种源试验初报[J]. 广西林业科学, 1997, 26(2): 66-68
- [3] 朱积余, 蒋 焱, 潘 文. 广西红锥优树选择标准研究[J]. 广西林业科学, 2002, 31(3): 109-113
- [4] 黄 瑶, 李朝奎. 叶绿体 DNA 及其在植物系统学研究中的应用[J]. 植物学通报, 1994, 11(2): 11-25
- [5] 金东雁, 黎孟枫, 候云德, 等. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992
- [6] 葛 颂. 同工酶与林木群体遗传变异研究[J]. 南京林业大学学报, 1988, 12(1): 68-77
- [7] 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性维护[J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 92-96
- [8] A Yacine, R Lumaret. Genetic diversity in *Holmoak (Quercus ilex L.)*: insight from several enzyme markers. *Silvae [J]. Genet*, 1989, 38(3-4): 140-148
- [9] 李 力, 王仁卿, 王中仁, 等. 青岛耐冬山茶的多样性() 居群的遗传多样性分析[J]. 生物多样性, 1996, 4(1): 1-6
- [10] Rong-Cai Yang, F C Yeh. Genetic consequences of in situ and exsitu conservation of forest trees[J]. *For Chr*, 1992, 68(6): 720-729
- [11] Grunwald C, Deutsch F, Eckstein D, et al. Wood formation in rol C transgenic aspen trees[J]. *Trees*, 2000, 14: 297-304
- [12] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1311-1320

2000 ~ 2005 年间甘肃农业大学被引频次 40 次以上的综述性论文

(数据来源: 中国学术期刊全文数据库科技论文引文数据库, 截止 2008 年 12 月 15 日)

序号	题名	第一作者	期刊名/发表年/期	被引频次
1	作物抗旱机制及其指标的研究进展与现状	倪郁, 等	甘肃农业大学学报/ 2001/ 01	81
2	区域生态承载力量化方法研究述评	邓波, 等	甘肃农业大学学报/ 2003/ 03	46
3	植物化感作用的机理、影响因素及应用潜力	柴强, 等	西北植物学报/ 2003/ 03	44

注: 仅限国内期刊登载的第一署名单位为甘肃农业大学的综述性论文.