

文章编号: 1009- 3575(2001)01- 0040- 04

红树植物白骨壤 (*Avicennia marina*) 遗传分化的 RAPD 分析*

赵萌莉^{1,2}, 林 鹏², 闻宇³

(1. 内蒙古农业大学生态环境学院, 呼和浩特 010018 2. 厦门大学生命科学院, 厦门 361005

3. 内蒙古林业勘察设计院, 呼和浩特 010010)

摘要: 采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析了分布于广西北海海岸的 3 个自然分布居群的白骨壤群落, 用 15 个随机引物进行 PCR 扩增, 3 个居群的 RAPD 多态位点的百分率分别为英罗湾 38.3%, 大冠沙 35.2%, 钦州湾 29.4%。3 个居群内的平均遗传距离分别为 0.108、0.147 和 0.165, 3 个居群两两之间的平均遗传距离分别为大冠沙-英罗湾 0.135, 大冠沙-钦州湾 0.163 和英罗湾-钦州湾 0.179。结果表明, 白骨壤居群内和居群间的遗传变异较低。

关键词: 白骨壤; 遗传分化; RAPD**中图分类号:** S718.46 **文献标识码:** A

GENETIC DIVERSITY OF MANGROVE PLANT- *Avicennia marina* ALONG BEIHAI COAST BY RAPD

ZHAO Meng-li^{1,2}, LIN Peng², WENG Yu³

(1. College of Ecological and Environmental Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018

2. Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005

3. Inner Mongolia Institute of Forestry Reconnaissance and Designing Huhhot 010020)

Abstract Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to analyzing population genetics of native *Avicennia marina*, an wide spread species whose natured population today is destroyed by mankind along Bahai Guangxi coast. Leaf samples were collected from 30 natural trees in the native population and 15 arbitrary primers were used to amplify 73, 71 and 68 bands that contain 28, 25 and 20 polymorphic RAPD loci in three populations respectively. The mean genetic distance intra-populations were 0.165, 0.147 and 0.108 while inter-population were 0.135, 0.163 and 0.179. The results show that either the intra- or inter-population genetic variety were low.

Key words *Avicennia marina*; genetic diversity; RAPD白骨壤 (*Avicennia marina*) 是先锋红树植物, 它耐贫瘠抗风浪, 可生长于淤泥滩、沙泥滩和沙质石砾海

* 收稿日期: 2000-11-21

基金项目: 国家教育部博士点基金项目资助

作者简介: 赵萌莉 (1963-), 女, 博士, 副教授, 从事植物生态的研究。

滩上,既可成纯林也可与其他红树植物混生和伴生。广西多开阔性海岸,滩涂的土壤类型多样,再加上长期以来的人为干扰,使白骨壤成为广西海岸分布最广,占据面积最大的红树植物类群,连片面积可达 $50\text{hm}^2 \sim 60\text{hm}^2$ 。本文应用 RAPD 标记技术初步研究了广西北海岸红树植物白骨壤 (*Avicennia marina*) 的遗传分化。

1 材料与方 法

1.1 野外采样

取样在广西北海岸进行。分别在大冠沙、钦州湾和英罗湾 3 个点,对不同生境的白骨壤进行采样。随机取样,选择胸径 4cm 的植株,每隔 10m 取 1 个样本,每个群体 10 株,采集幼叶, -20°C 贮存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取,采样 CTAB 法 (Saghai-Marooff 等, 1984) 略加改进。称取 0.5g 叶片,加液氮研磨成粉末,加入预热至 65°C 的 CTAB 抽提缓冲液 (2% CTAB, 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA 及 1% β -巯基乙醇),混匀, 65°C 水浴加热 90min , 500r/min 离心 5min ,取上清加入等体积的氯仿:异戊醇抽提, 5000r/min 离心 10min ,取上清加入 $2/3$ 体积的异丙醇, -20°C 冰浴 30min , 10000r/min 离心 10min ,弃上清。沉淀溶于适当 TE (10mM Tris-HCl 1mM EDTA, pH 8.0),加入 RNAase 37°C 浴育 1h ,酚:氯仿 ($1:1:V/V$) 抽提后,加入 $1/10$ 体积的醋酸钠 (pH 5.2) 及 2 倍体积的无水乙醇沉淀,离心弃上清,沉淀溶于适当 TE 溶液中, 0.8% 琼脂糖凝胶检测所提 DNA,紫外分光光度计上,波长 260 和 280 处分别测定吸光度值 (A),根据 A_{260}/A_{280} 比值判断 DNA 样品的纯度,由 A_{260} 值估算 DNA 浓度。

1.3 扩增引物

购自 Sangon 公司,选择能获得较好扩增产物的引物对各群体进行扩增。所用引物见表 1。

表 1 扩增所用引物及序列

引物	序列	引物	序列
S ₁	GTTTCGCTCC	S ₉	TGGGGGACTC
S ₂	TGATCCCTGG	S ₁₀	CTGCTGGGAC
S ₃	CATCCCCAGT	S ₁₁₀	CCTACGTCAG
S ₄	GGACTGGAGT	S ₁₁₂	ACGCGCATGT
S ₅	TGCGCCCTTC	S ₁₁₇	CACTCTCCTC
S ₆	TGCTCTGCCC	S ₁₁₉	CTGACCAGCC
S ₇	GGTGACGCAG	S ₁₂₁	ACGGATCCTG
S ₈	GTCCACA CGG		

1.4 PCR 反应

参考 Williams 等 (1990) 的方法,略加改进。扩增反应总体积 $25\mu\text{l}$ 其中含 100mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% (w/v) 明胶, $100\mu\text{M}$ dATP, dCTP, dGTP, dTTP, $0.2\mu\text{M}$ 的随机引物, 80ng 左右的基因组 DNA, 0.5 个单位的 Taq 酶 (购自华粤公司),混合后加入 1 滴石蜡油。在 PE480PCR 仪上进行扩增,反应程序为 94°C 1min , 36°C 1min , 72°C 2min , 40 个循环, 72°C 延伸 7min 。

1.5 扩增产物的分离与鉴定

扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,以 λ DNA EcoRI-HindIII (MBI 公司) 为相对分子质量标准,紫外观察并照相。

1.6 数据的统计处理

任意 2 个样本间的遗传差异用遗传相似度 S 来衡量,

$$S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

其中 N_{xy} 是 x, y 两个个体共享的 RAPD 标记数。

$N_x N_y$ 分别为 x, y 个体拥有的 RAPD 标记数
任意 2 个样本间的遗传距离 (D)

$$D = 1 - S$$

2 结果与分析

2.1 扩增条带分析

通过对 20 个引物进行筛选, 其中 15 个引物 (表 1) 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 (附图)。在实验中出现的条带记为“1”, 没有或过弱的条带记为“0”, 分别得到 3 个种群的 RAPD 扩增数据。统计结果见表 2

3 个居群分别扩增出 73、71 和 68 条带, 其中多态性条带分别为 28、25 和 2 条, 多态位点百分数分别是英罗湾 38.3%, 大冠沙 35.2%, 钦州湾 29.4%。

2.2 白骨壤天然居群的遗传变异分析

2.2.1 居群内的遗传变异 遗传相似度 (genetic similarity, S) 及遗传距离 (genetic distance, D) 是评估群体 RAPD 变异水平的重要指标。我们用这两个指标, 根据白骨壤居群内变体个体两两之间的共有的 RAPD 标记数, 计算出各居群的遗传相似度 (S) (表 3)。由表 3 可以看出, 不同居群遗传相似度不同, 其中英罗湾居群遗传相似度值最小, 为 0.835, 即个体的遗传距离最大, 说为 0.165, 说明其遗传多样性最为丰富; 而钦州湾居群 S 平均值最大, 为 0.892, 即遗传距离值最小, 为 0.108, 其遗传多样性相对最低; 而大冠沙居中, 其遗传相似度为 0.853, 遗传距离为 0.147。

表 3 各居群内遗传一致度及遗传距离

居群名称	大冠沙	钦州湾	英罗湾
S	0.853	0.892	0.835
Sm _{ax}	1	1	1
Sm _{in}	0.657	0.648	0.657
D	0.147	0.108	0.165

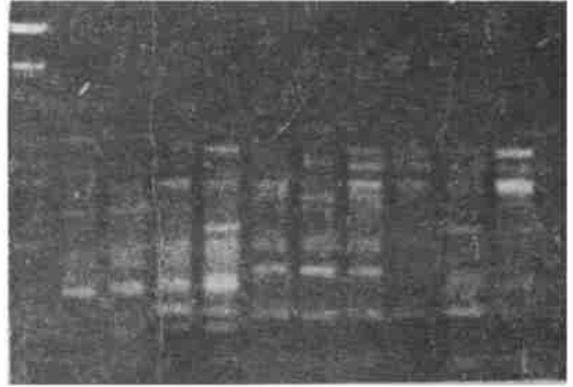
S 为平均遗传相似度, Sm_{ax} 为最大遗传相似度, Sm_{in} 为最小遗传相似度, D 为遗传距离

2.2.2 居群间的遗传距离 利用 3 个居群样本在相同引物条件下扩增结果进行数据统计及分析, 计算出各居群间的遗传相似度和遗传距离, 见表 4。

表 4 各居群间的遗传相似度和遗传距离

居群	大冠沙 - 英罗湾	大冠沙 - 钦州湾	英罗湾 - 钦州湾
S	0.865	0.837	0.821
Sm _{ax}	1	1	1
Sm _{in}	0.767	0.817	0.782
D	0.135	0.165	0.179

由表可见, 3 个居群两两间的遗传相似度大冠沙与英罗湾最大, 为 0.865, 其次为大冠沙与钦州湾, 为 0.837, 英罗湾与钦州湾之间的相似度最小, 为 0.821。而遗传距离则为大冠沙与英罗湾 < 大冠沙与钦州湾 < 英罗湾与钦州湾, 总的来看, 白骨壤居群间遗传变异水平相对较低。



附图 S103 对大冠沙种群的扩增

表 2 白骨壤三个自然居群中检测到的多态位点数及百分率

居群名称	RAPD 位点总数	多态位点数	多态位点百分率 (%)
大冠沙	73	28	38.35
英罗湾	71	25	35.21
钦州湾	68	20	29.41

3 讨论与结论

红树林是生长在热带亚热带海岸潮间带的 1 种木本植物, 它是海岸河口生态系统的主要生产者, 向近海提供大量的有机碎屑, 对沿海渔业有重大影响。长期以来, 广西沿海群众砍伐白骨壤果实食用, 在其林下挖取“星囊虫”等海产品, 特别是近年来, 随着沿海经济的发展, 沿海围垦等日益严重, 造成了其分布面积日趋减少, 目前, 广西海岸的白骨壤多为次生林。

由我们的 RAPD 分析结果表明, 就广西海岸 3 个分布点的白骨壤居群而言, 虽然 3 个采样点间生境条件差异较大, 但其居群内和居群间的遗传变异水平较低, 这与等位酶对其它红树植物的分析结果一致, 是由于红树植物分布的相对均质性和胚轴的漂浮流动性造成的, 但广西海岸白骨壤遗传变异水平较低, 与人为破坏有密切的关系。

从进化生物学的角度看, 遗传多样性的物种进化状态的标志。对广西海岸 3 个居群白骨壤的 RAPD 分析, 表明英罗湾居群内的变异水平最高, 虽然英罗湾白骨壤不是建群种, 但生境变化较大, 从生长状况看, 在中内滩的淤泥生境中, 生长较好, 高度达 2.5m, 有明显的主干, 而在其它生境中, 生长较差, 呈灌丛状。大冠沙样地的生境单一, 土壤为砾质粉壤土, 或多砾质细沙土, 中滩和外滩为砾质粗沙土, 其生长状况为从内滩到外滩逐渐变差, 多为灌木状, 树高 1.4m 左右。而钦州湾因围海养殖, 红树林严重退化, 树高 1m 以下。可见, 在广西海岸, 人为干扰是导致红树林衰退的 1 个重要因素。如果给予适当的保护及采取有效的抚育措施, 迅速增加居群数量, 恢复其生机勃勃的自然状态是完全可能的。

参 考 文 献:

- [1] 林鹏. 红树林 [M]. 北京: 海洋出版社, 1984. 46- 47.
- [2] 范航清, 尹毅, 劳丽荣. 广西海岸白骨壤红树植物地上部生物量的相关分析 [J]. 广西植物研究, 1993, 9(2): 25- 30.
- [3] 李春香, 杨群, 周见平等. 水杉自然居群遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1999, 38(1): 59- 63.
- [4] Hamrick, J. L. & Schumacher, A., Understanding the genetic structure of plant populations: some old problems and a new approach [M]. In Gregorius, H. R. (ed.), Population Genetics in Forestry, Berlin, Springer-Verlag, 1985, 50- 70.
- [5] Saghai-Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgenson, R. A., and Allard, R. W., Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [M]. Proc Natl Acad Sci, U. S. A., 1984, 81: 8014- 8018.
- [6] Paranj M., Lakshmi M. et al. Molecular phylogeny of mangroves. Use of molecular markers in assessing the interspecific genetic variability in the mangrove species *Acanthus ilicifolius* Linn (*Acanthaceae*) [M]. Theor Appl Genet 1997, 94: 1121- 1127.
- [7] Williams, J. G. K., Kubelk, A. R., Livak, J., Rafalski, A. and Tingy, S. V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [M]. Nucleic Acids Res 1990, 18: 6531- 6535.