

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 200326071

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

优质红锥遗传多样性分析
Analysis of genetic diversity in
Castanopsis hystrix A.DC.

王 蕾

指导教师姓名: 陈亮 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月

论文答辩日期: 2006 年 7 月

学位授予日期: 2006 年 月

答辩委员会主席: 王鸣刚 教授

评 阅 人: _____

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成绩。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
略缩词	5
1 前言	6
1.1 植物遗传多样性研究的发展	6
1.2 分子标记技术在植物遗传多样性研究中的应用	7
1.3 <i>rbcL</i> 基因序列比对分析	13
1.4 同工酶水平研究优质红锥遗传多样性	14
1.5 光合作用与叶绿素含量	15
1.6 本研究的的意义	16
2 材料和方法	16
2.1 材料和仪器	16
2.2 方法	20
2.2.1 ISSR分子标记	21
2.2.2 <i>rbcL</i> 基因序列分析	21
2.2.3 同工酶分析	24
2.2.4 光合速率与叶绿素含量的测定	25
3 结果与分析	26
3.1 优质红锥模板 DNA 提取结果	26
3.2 优质红锥的 ISSR 扩增结果	27
3.3 聚类分析结果	28
3.4 <i>rbcL</i> 基因 PCR 扩增结果	29
3.5 阳性重组子酶切鉴定结果	30
3.6 核苷酸序列分析对比结果	30
3.7 氨基酸序列比对结果	31
3.8 同工酶分析结果	32
3.9 光合速率及叶绿素含量测定结果	33
4 讨论	37

4.1	ISSR 用于红锥遗传多样性分析的可行性 及扩增条件优化	37
4.2	10 个红锥品系形成较大遗传差异	39
4.3	影响林木群体遗传变异和分化的因子	40
4.4	影响红锥遗传多样性的原因	41
4.5	红锥遗传多样性的保护	42
5	小结	43
6	参考文献	45
7	附录	54

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

Chinese abstract	1
English abstract	3
1 Introduction	6
1.1 Reseach evelopments of genetic variability.....	6
1.2 Application of molecule mark in genetic variability	7
1.3 Sequence analysis of <i>rbcl</i> gene.....	13
1.4 Isozymes analysis.....	14
1.5 Photosynthetic effiency and content of chlorophyl.....	15
2 Materials and methods	16
2.1 Materials.....	16
2.2 Methods.....	20
2.2.1 ISSR.....	20
2.2.2 Analysis of <i>rbcl</i> sequence.....	21
2.2.3 Isozymes analysis.....	24
2.2.4 Photosynthetic effiency and content of chlorophyl.....	25
3 Results	26
3.1 Distilled DNA.....	26
3.2 Results of ISSR-PCR.....	27
3.3 Results of clustering.....	28
3.4 PCR of <i>rbcl</i> gene.....	29
3.5 Identification of recombination.....	30
3.6 Alignment of nucleotide sequence.....	30
3.7 The result of amino acid sequence alignment.....	31
3.8 The result of isozymes analysis.....	32
3.9 Results of Photosynthetic effiency and content of chlorophyl.....	33
4 Discussion	37
4.1 Feasilbility of ISSR using in genetic variability and optimizing of	

ISSR-PCR.....	37
4.2 Distinct difference of genetic variability.....	39
4.3 Infection of forest genetic variability.....	40
4.4 Analysis of genetic variability in <i>Castanopsishystrix</i>	41
4.5 Protection of <i>Castanopsishystrix</i>	42
5 Summary.....	43
6 Reference.....	45
7 Appendix.....	54

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

红锥(*Castanopsis hystrix* A. DC.), 属壳斗科常绿乔木, 具有生长快、材质优、适应广等优良特性。本实验目的是通过 ISSR 分子标记、过氧化物和酯酶同工酶、*rbcl* 基因序列差异比对, 从不同角度探讨 10 个优质红锥品系的遗传多样性, 并且结合重要生理指标进行综合分析。主要实验结果如下:

(1) 通过 ISSR 对 10 个优质红锥品系亲缘关系分析:

实验确定红锥 ISSR-PCR 最佳扩增条件为 20 μ l 反应体系中: 模板 60 ng, 1 U Taq 酶, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , dNTP 0.25 mmol/L, 引物 0.5 μ mol/L, 2% 甲酰胺。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52~55 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。利用 STATIS 统计软件的欧氏可变类平均法构建类型之间的分子系统树, 聚类分析可将 10 个优质红锥品系分为四类。

(2) 同工酶分析:

过氧化物同工酶: 电泳结果表明红锥过氧化物同工酶可在三个位置显带, 并集中分布于两个区域(A、B), 其中 A 区可认为是红锥的特征谱带, 浦北具有 B 区的特殊条带, 可以将其与其它红锥品系区分开来。

酯酶分析: 酯酶谱带的分布据 R_m 的大小分为 A、B、C、D 三个区段。即, A 区: 0.38~0.44; B 区: 0.49; C 区: 0.57; D 区: 0.81~0.92。A 区靠近负极, 所带负电荷较弱, 电泳速度慢, 共有 2 条谱带, R_m 呈现逐渐增大规律, 为红锥的特征谱带。B 区较 A 区靠近正极, 电泳速度较快, 共有 1 条谱带, 为广东 2 号、凭祥、博白共有。C 区电泳速度较快, 共 1 条谱带, 为博白、苍梧共有。D 区电泳速率最快, 共 3 条谱带, 其中浦北占有三条谱带, 可以看作是其特有带型, 博白占有其中一条。

(3) *rbcl* 基因序列比对分析:

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, 序列比对表明从 256 bp~1455 bp 10 个红锥品系之间 16 处碱基发生变异, 变异率为 1%, 其中 306 bp 处和 634 bp 处 10 个红锥品系较对照同属的 *castanopsis lucida* 发生相同的变异, 可以看作属内进化信息碱基。ISSR 聚类的第一类群中的广东 1 号、容县、凭祥、东兰较 *castanopsis lucida rbcl* 序列均发生碱基变异, 并且容县和凭祥在 426 bp 处发生相同变异, 第四类群浦北在 3 处碱基位置较其它 9 个品系发生变异, 其它第二、第三的 3 个品系较 *castanopsis lucida* 没有发生变异, 可以推论

ISSR 分析的第二、三类群与同属的 *castanopsis lucida* 进化上最接近。进而从翻译成的氨基酸序列比对分析, 16 处碱基变异共引起 8 处氨基酸序列变异。

(4) 光合速率及叶绿素含量分析:

10 个红锥品系光合速率均呈双峰曲线, 于 10:30 和 16:30 达到最高峰, 其中浦北光合速率最高, 东兰光合速率最低。叶绿素含量以浦北最高, 东兰最低。

关键词: 红锥; 遗传多样性; 分析

Abstract

Castanopsis hystrix A. DC. is a kind of evergreen arbors having many eximious characters such as : growing fast, excellent texture, abroad acclimatization. In this study, inter-simple sequence repeat (ISSR)、peroxidase isozymes、esterase isoenzymes、analysis of *rbcl* gene sequences were evaluated for its potential use in the genetic variability of 10 cultivars of *Castanopsis hystrix* A. DC., and then combined with other physiological analysis, we can do a all-sides research about these 10 cultivars of *Castanopsis hystrix* A. DC.

The mainly important experiment results were as follows:

1. ISSR analysis

Statis software was used to calculate the Nei' s genetic distance and a dendrogram was constructed based on UPGMA cluster analysis. These 10 cultivars surveyed were classified into 4 major groups. After many tries, we find the optimum programming of ISSR-PCR , and it is: template 60 ng, 1 U Taq, 1.5 mmol/L Mg²⁺, dNTP 0.25 mmol/L, primers 0.5 μmol/L, 2% dimethyl formamide dimethyl acetal in 20 μL reaction system. The proceeding of ISSR-PCR is: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 52~55 °C 45 s, 72 °C 2 min, 40 cycles, 72 °C 7 min.

2. Isozymes analysis

Two isozymes (peroxidase isozyme, esterase isoenzyme) of 10 cultivars were studied by means of polyacrylamid gel electrophoresis. The results showed that several basic isozyme bands were observed in all cultivars and they have their own characteristic bands which are different from each other. Analysis of peroxidase isoenzyme shows that these three bands distribute in two zones (A, B), Pubei has one special band in C-zone. Analysis of esterase isoenzyme shows that these seven bands

distribute in three zones (A, B, C, D), and it is: A zone: 0.38~0.44; B zone: 0.49, C zone: 0.57; D zone: 0.81~0.92. Bobai and Cangwu have one special band in B-zone, Bobai, Cangwu and No. 2 of Guangdong share one special band in C-zone. Pubei has three special bands in C-zone.

3. *rbcL* gene sequences analysis

Trough analysing of *rbcL* gene sequences acquired from PCR, we find sixteen mutations in 256 bp~1455 bp, so the mutation ratio is 1%. Compared to *castanopsis lucida*, between 306 bp and 634 bp, they have two characteristic mutations of their own, so it can be different from *castanopsis lucida*. Compared to *castanopsis lucida*, Donglan, Pingxiang, Rongxian, No. 1 of Guangdong which belong to the first group in ISSR analysis, all of them have mutations in *rbcL* gene sequences. Pubei has three mutations comparing with other nine *Castanopsis hystrix* A. DC., so we think it is very special. The second and third groups in ISSR analysis are similar with *castanopsis lucida*.

4. Physiological analysis

Photosynthetic efficiency and content of chlorophyll are different in these 10 cultivars. Of all, Pubei has the highest levels, Donglan has the lowest levels.

Key words: *Castanopsis hystrix* A. DC.; genetic variability; analysis

略缩词

ISSR	Inter- Simple Sequence Repeats	微卫星 DNA 或短串联重复序列
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA	随机扩增多态性DNA
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
DNA	Deoxyribonucleotide	脱氧核糖核酸
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
Bis	Bis-Acrylamide	N,N 甲叉双丙烯酰胺
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid	乙二胺四乙酸
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
dNTP	Deoxyribonucleic triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
TBE		Tris-硼酸缓冲液
Tris	Tri hydroxymethyl methylamine	三羟甲基氨基甲烷
LB	Luria Bertan	培养基
CTAB	cetyltriethylammonium bromide	十六烷基三甲基溴化铵
RNAas	Ribonuclease A	核糖核酸酶
bp	Base pair	碱基对
Kb	Kilo-base pair	千碱基
UPGMA		非加权组平均法

1 前言

遗传多样性是指种内基因的变化,包括种内显著不同的种群间和同一种群内的遗传变异,也称为基因多样性。在物种内部因生境的不同也会产生遗传上的多样化,各种生物不同亚种或地方品种中都存在着丰富的遗传多样性,是物种以上各水平多样性的重要来源。一个种群遗传多样性越高或越丰富,适应环境的能力就越强。可见,物种或种群进化潜力和适应环境的能力取决于遗传多样性的大小^[4]。植物遗传多样性研究是植物种质资源保护及开发利用的基础,它是根据遗传标记来进行的。对当前优良品种的遗传多样性进行准确的评价可以为亲本选配、后代遗传变异程度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能否成功实现的关键^[2]。

检测遗传多样性的方法是随着生物学研究层次的提高和实验手段的不断改进而逐步发展起来的。从形态学水平、细胞学(染色体)水平、生理生化水平直至达到目前的分子水平。无论在什么层次上进行研究,其目的都是为了揭示遗传物质的变异。迄今为止,任何一种检测遗传多样性的方法都存在各自的优点和局限性,还找不到一种可以完全取代其它方法的技术。因此,包括经典的形态学、细胞学、以及同工酶和DNA 技术在内,各种方法都能从各自的角度提供有价值的信息,都有助于我们认识遗传多样性及其生物学意义^[3]。

1.1 植物遗传多样性研究的发展

1860 年以来,以孟德尔为代表的经典遗传学采用的是最直接的表现型性状作为了解遗传差异的标记。由于表现型和基因型之间存在着基因表达、调控、个体发育等复杂的中间环节,如何根据表现型差异来反映基因型差异,就成为用表现型性状检测遗传多样性的关键。在形态学层次上,利用表现型来研究遗传多样性具有简便、易行、快速的特点。但以后的研究表明,表现型性状大多不是单基因控制的,并且大部分根本不是可遗传性状,而是环境饰变等作用的结果。用表现型性状差异来研究植物遗传多样性有很大的不确定性和局限性。因此,仅仅依赖表现型性状是远远不够的,还必须进行更深层次的研究,并加以比较验证。染色体水平的遗传多样性研究又称细胞学标记,主要体现在染色体结构变异(缺失、易位、倒位、重复)、数目变异(整倍体、非整倍

体) 及染色体形态、缢痕和随体等核型特征, 这些特征的变异使种内出现丰富的多样性。用同功酶标记研究遗传多样性始于1966年, 如HUBBY等^[4]对果蝇种群遗传变异的定量研究, 是近几十年来应用最普遍的方法。根据中心法则, 组成酶蛋白质多肽链的氨基酸种类和顺序是由DNA 核苷酸链的碱基编码所决定。所以, 当DNA 链上的酶结构基因发生点突变时, 一个或多个核苷酸发生了替换, 就会导致由它编码的氨基酸改变, 从而直接影响酶蛋白质的构型和静电荷。通过电泳能够分离和鉴别这种酶蛋白质变体, 推断假定酶基因位点的所有等位基因的存在^[4]。然而, 以蛋白质变异来推定基因变异存在着理论上的缺陷。蛋白质仅反映了基因可编码序列的状况, 而实际上此部分序列比许多非编码序列的变异水平低得多; 同义密码子的第3 位碱基的置换无法反映在氨基酸序列上。而且, 酶很容易失活, 野外取样后需立即分析。因此, 等位酶分析法有一定局限性, 一般只用于研究种间差异和种内遗传多样性分析。20世纪60年代, 用分子分析手段研究遗传多样性的全新方法应运而生, 主要包括对DNA、RNA 的分子标记和蛋白质标记。该法基本不受环境和发育状态的影响, 需要样品量少, 适用于珍稀、濒危物种的研究, 从生物的遗传本质入手, 便于在较高水平上进行统一比较。

1.2 分子标记技术在植物遗传多样性研究中的应用

林木群体遗传结构的变异和因此带来的群体遗传多样性是遗传学研究的重要领域。天然群体的遗传多样性程度和分布受遗传漂变、迁移、突变和选择等因素的综合影响, 其基因频率会在一定的水平上波动, 即遗传多样性会反映在DNA 水平上。分子标记可以有效地揭示林木种群间及种群内的遗传多样性, 进而分析其系统分化规律、研究群体遗传结构、多样性程度, 了解基因流动和渗入的方向和作用, 为进行种源区划、估计基因保存时的取样策略、交配系统和模式以及鉴定具有遗传多样性和生产力最佳搭配的杂交群体提供参考; 同时, 对了解林木的进化过程、开展林木遗传育种和引种驯化均具有指导意义。目前已经开发了几十种基于DNA 多态性的分子标记, 在方法上大体可分为三类^[3]: 非PCR 类 (Polymerase chain Reaction, 聚合酶链式反应), 如RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性酶切片段长度多态性)、VNTRS (Variable Number of Tandem Repeats, 可变数目串联重

复位点)等;以PCR为核心的引物技术类,如RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA,随机扩增的多态性DNA)、AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism,扩增片段长度多态性分析)等;位点标定PCR类(Site-targeted PCR),如SCAR(Sequence characteristic Amplified Region,序列特异扩增区域)、SSR(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)等。

1.2.1 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)分析

RFLP是一种理想的遗传标记,共显性且不受环境和发育阶段的影响,直接反映DNA水平的变异,具有揭示基因组各部分多种类型变异的潜力。但对DNA样品的量(2~10 ug)和纯度要求都比RAPD(0.5~5.0 ng)高得多,得到的带谱也更为复杂且难于解释,放射性物质的使用安全也是限制RFLP应用于实践的一个因素。RFLP是一项复杂的技术,是否能成功的说明问题与分析对象DNA以及限制性内切酶和探针的选择关系很大。MONTE等利用21个RFLP探针,对小麦族的16个属54份材料进行了分析,研究了不同基因组的亲缘关系。贾继增等^[5]对小麦21条染色体RFLP作图位点遗传多样性分析表明:普通小麦遗传多样性非常贫乏,不同国家来源的品种相似系数达0.8以上;四倍体小麦(AABB)和山羊草(DD)为亲本品种系中,对应的染色体上有较高的遗传多样性,说明小麦的原始供体种是丰富现代栽培小麦遗传多样性的重要资源;在小麦的A,B,D 3个基因组中,B基因组的遗传多样性最高,D基因组最差(以1D最甚),A居中。

1.2.2 RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)分析

RAPD是PCR的一种变形。RAPD图谱间的差异可因4种方式产生:①核苷酸置换造成引物与结合位点无法匹配;②某个引物结合位点缺失(deletion);③两引物结合位点间的大片段插入导致间距过大而扩增中断;④插入或删除改变了扩增产物的大小。RAPD方法简便、快速、灵敏,但与RFLP及等位酶之类共显性标记相比有一个大的缺陷,即RAPD是显性标记,无法直接用于基因型分析。RAPD结果虽不太精确,但确实提供了足够的多态性以分辨种以下类型^[6]。NGUYEN等^[7]利用40个RAPD引物对15个小麦品种的遗传多样性进行了分析。CORBELLINI利用RAPD标记进行了杂交小麦亲本的遗传多样性研究,海林等^[8]利用RAPD标记分析了小麦耐盐种质的遗传多样性,结果表

明,共产生200 条扩增片段,多态性片段数为172 条,扩增片段的多态性百分率为86% ,供试的24 份材料相似系数在0.21~0.97 之间。

1.2.3 AFLP(Amplified fragment length polymorphism)分析

AFLP 即扩增片段长度多态性,是1993 年由荷兰科学家ZABFAU 和VOS 发展起来的一种检测DNA 多态性的新方法。这种方法的原理是基于对植物基因组总DNA双酶切经PCR 扩增后的限制片段进行选择,具体是植物基因组DNA 经限制性内切酶双酶切后,形成分子量大小不等的随机限制性片段,将特定双链接头(adapter) 连接在这些DNA 片段的两端,形成一个带接头的特异片段,作为DNA扩增的模板。接头序列以及与其相连的限制位点作为随后进行的限制片段扩增的引物结合位点。PCR 引物3' 末端含有选择核苷酸,选择核苷酸延伸到酶切片段区,这样就只有那些两端序列能与选择核苷酸配对的限制性酶切片段被扩增,扩增片段通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测。与其他分子标记相比,它结合了RFLP 和RAPD 各自的优点,方便快捷。只需要极少量DNA 材料,不需要Southern 杂交,不需要预先知道DNA的顺序信息,试验结果稳定可靠,可以快速获得大量的信息,而且再现性高,重复性好。因而,非常适合于品种指纹图谱的绘制,遗传连锁图的构建及遗传多样性的研究。BARRETT B A等^[9]利用AFLP 技术评价适应于西北太平洋旱地生产的春、冬小麦代表品种的遗传多样性,结果表明AFLP 对于小麦遗传多样性的研究来说是一种非常有效的技术。美国康耐尔大学的BLAIR 利用AFLP 技术评价54 份水稻品种的遗传多样性,研究其系统发育和分类,并与同功酶生化标记及RFLP 标记比较,发现不仅其结论一致,而且认为AFLP 对于研究水稻品种的遗传变异和构建基因组图谱更为理想。

1.2.4 SSR(Simple Sequence Repeats 简单序列重复)分析

SSR 亦称微卫星(Microsatellite)技术,是指由2~6 个碱基组成的基本序列串联重复组成的短片段,为共显性标记。由于该技术具有简便、快速、稳定性高和等位基因多样性高等特点,在基因组研究中作为一种主要的分子标记技术,已广泛应用于遗传图谱的构建^[10]、比较基因组研究^[11]、遗传多样性分析^[12]和系统学研究^[13]之中。它利用基因组中二核苷酸,三核苷酸或四核苷酸进行简单串联重复,从而设计PCR 引物通过PCR 扩增来检测多样性。一般认为微

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库