

代文娟,黎乾坤,骆文华,等. 狭叶坡垒迁地保护种群的 RAPD 多样性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):39-41.

狭叶坡垒迁地保护种群的 RAPD 多样性分析

代文娟¹, 黎乾坤^{1,2}, 骆文华¹, 唐文秀¹, 赵 博¹, 盘 波¹, 黄仕训¹

(1. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 桂林理工大学, 广西桂林 541004)

摘要:采用 RAPD 分子标记技术对 2 个迁地保护的狭叶坡垒种群进行遗传多样性分析,结果表明,10 条引物共扩增出 69 个位点,其中 36 条具有多态性,多态位点比例为 52.17%,其中,西双版纳种群的多态位点百分比为 36.23%;桂林种群为 15.94%。2 个迁地保护种群的 Shannon 平均值为 0.1178,Nei's 多样性指数平均值为 0.0757,遗传分化系数 G_{st} 为 0.634 0,63.41% 的遗传变异存在于种群间。

关键词:狭叶坡垒;遗传多样性;RAPD;种群;迁地保护

中图分类号: Q943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0039-02

狭叶坡垒 (*Hopea chinensis*) 别称华南坡垒、窄叶坡垒,国家一级重点保护野生植物^[1],是龙脑香科分布在我国少数几个树种之一,是广西特有珍贵用材树种,具有重要的保护和经济价值。由于人为干扰及其自身生物、生态学特性限制,其野外种群数量日渐稀少,分布范围日渐萎缩,已濒临消失。目前,在广西南宁、桂林和云南西双版纳得到迁地保护,并开花结实。迁地保护后的遗传多样性大小能够反映保护的有效性和物种适应环境的能力,也能进一步分析其进化潜力和未来命运,尤其是探讨物种稀有或濒危的原因及过程^[2]。因此,对迁地保护后的种群进行遗传分化、种群遗传结构及种群间基因流等方面的研究非常重要^[3]。目前,DNA 随机扩增多态性 RAPD 分子标记已经广泛应用于遗传多样性、遗传结构和遗传图谱的研究中^[4-9]。利用 RAPD 技术,研究狭叶坡垒 2 个迁地保护种群的遗传多样性,为种质资源的保存、测定、评价和育种策略的制定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

狭叶坡垒材料取自广西桂林植物园和云南西双版纳植物园,每个植物园各 1 个种群,每个种群 10 株成年植株的当年生嫩叶,硅胶干燥保存 10 个月。采样种群地的基本概况见表 1。

表 1 采样种群地的基本概况

种群	样本数	纬度 N	经度 E	海拔 (m)	年均气温 (°C)	相对湿度 (%)
西双版纳 (BN)	10	21°41'	101°25'	570	21.4	83
桂林 (GL)	10	25°01'	110°17'	170	19.2	78

收稿日期:2013-04-02

基金项目:国家科技基础条件平台建设项目(编号:2009FY120200);

广西植物研究所基本业务费(编号:桂植业 12009);广西科技创新能力与条件建设项目(编号:桂科能 11217028)。

作者简介:代文娟(1981—),女,贵州黔西人,助理研究员,从事珍稀濒危植物遗传多样性研究。E-mail:dwj@gxib.cn。

通信作者:黄仕训,研究员,从事珍稀濒危植物保护。E-mail:hsx@gxib.cn。

用于 RAPD-PCR 反应的 Buffer、MgCl₂、dNTPs、Taq DNA 聚合酶等均购于上海生物工程有限公司,RAPD 引物也由上海生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用改良后的 CTAB 法^[10]。

1.2.2 反应体系和扩增程序 扩增体系为:1 × PCR buffer, 3 mmol/L Mg²⁺, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 U/25 μL Taq 聚合酶, 0.4 μmol/L 引物, 5 ng/μL DNA 模板,最后用无菌超纯水补足至 25 μL。最佳扩增反应条件为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环;72 °C 最后延伸 7 min。

1.2.3 扩增产物检测 PCR 扩增在 Biometra T Professional PCR 仪(华粤企业集团有限公司)上进行。反应结束后, 10 μL 上样液含 1 μL Gel Green 核酸染料,在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 60 min,电压设定为 120 V,于生物电泳成像分析系统(美国 UVP)拍照记录。

1.2.4 统计分析 按条带有或无分别赋值,有带记为 1,无带记为 0,形成 1、0 数据矩阵。利用 Popgene 32 软件分析各个居群的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、多态位点百分率,以及在物种水平上整个居群的遗传变异(H_t)、居群内遗传多样性(H_s)、遗传分化系数(G_{st}),以及 Shannon 多样性指数(I)和 Nei's 遗传一致度(H)^[11]。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及扩增结果

从 150 条 RAPD 随机引物中筛选出电泳谱带清晰且多态性较好的 10 条引物(表 2),并对 2 个种群的 20 个个体进行 RAPD 分析,共检测出 69 个位点,范围在 400 ~ 2 000 bp(图 1),平均每条引物扩增出 6.9 个条带。

表 2 10 条 RAPD 引物序列

引物编号	引物序列(5'→3')	引物编号	引物序列(5'→3')
S11	GTAGACCCGT	S21	CAGGCCCTTC
S13	TTCCCCCGCT	S22	TGCCGAGCTG
S16	TTTGCCCGGA	S25	AGGGGTCTTG
S17	AGGGAACGAG	S39	CAAACGTCGG
S19	ACCCCGGAAC	S40	GTTGCCATCC

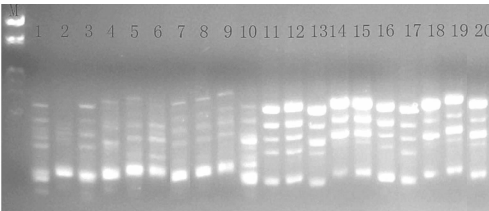


图1 S19扩增DNA样品的电泳

2.2 遗传多样性分析

用 Popgene 32 软件对 2 个种群的遗传多样性进行分析。由表 3 可见, 36 个为多态性条带, 多态位点百分比为

52. 17%, 其中, 西双版纳种群的多态位点较多, 为 25 个, 多态位点百分比为 36. 23%; 桂林种群的多态位点较少, 为 11 个, 多态位点百分比为 15. 94%; 等位基因数 (N_a) 1. 159 4 ~ 1. 362 3, 平均值为 1. 260 9; 有效等位基因数 (N_e) 从 1. 082 5 到 1. 161 8, 平均值为 1. 122 2; 用 Shannon 多样性指数估算 2 个种群间遗传多样性变化幅度为 0. 0747 ~ 0. 1609, 平均值为 0. 117 8; 用 Nei's 多样性指数估算 2 个种群中的遗传变异范围为 0. 048 8 ~ 0. 102 5, 平均值 0. 075 7。在物种水平上, 多态带百分率 P 为 57. 95%; 等位基因数 (N_a) 为 1. 579 7; 有效等位基因数 (N_e) 为 1. 377 4; Shannon 多样性指数为 0. 303 3; Nei's 多样性指数为 0. 206 6。

表 3 两个迁地保护种群的遗传多样性比较

种群	等位基因数 (N_a)	有效等位 基因数(N_e)	Nei's 多样性 指数 H	Shannon 多样性指数 I	多态位点数 (个)	多态位点百分率 (%)
西双版纳 (BN)	1. 362 3	1. 161 8	0. 102 5	0. 160 9	25	36. 23
桂林 (GL)	1. 159 4	1. 082 5	0. 048 8	0. 074 7	11	15. 94
平均	1. 260 9	1. 122 2	0. 075 7	0. 117 8	18	26. 09

2.3 遗传结构分析

2 个狭叶坡垒种群间的遗传分化状况由总的遗传多样性 (H_t)、种群内遗传多样性 (H_s)、种群间基因分化系数 (G_{st}) 描述。经统计分析, 2 个种群的总遗传变异 H_t 为 0. 2066, 种群内遗传变异 H_s 为 0. 075 6, 种群间遗传变异为 0. 131 0, 群体间遗传分化系数 G_{st} 为 0. 634 0。在总的遗传多样性中, 63. 41% 的遗传变异存在于种群间, 36. 59% 的遗传变异存在于种群内。

3 小结与讨论

一个物种遗传多样性越高或遗传变异越丰富, 对环境变化的适应能力就越强, 越容易扩展其分布范围和开拓新的环境, 因此, 对遗传多样性的研究可以揭示物种的进化历史, 也能进一步分析其进化潜力和未来命运, 尤其有助于物种稀有或濒危原因及过程的探讨^[2]。

多态位点百分率虽是遗传多样性的一个粗略估计, 随引物选择标准会有较大差异, 但可以比较正确地显示物种居群内和居群间的遗传多样性水平, 而遗传多样性高低, 决定着物种对环境的适应能力及其利用潜力^[12~15]。本研究结果表明: 2 个迁地保护种群的遗传多样性均不高, 多态位点百分率平均值为 26. 09%, 其中西双版纳种群为 36. 23%, 桂林种群只有 15. 94%; 在 Shannon 多样性指数、Nei's 多样性指数及多态位点百分率等方面, 西双版纳种群均高于桂林种群。造成桂林种群遗传多样性水平略低于西双版纳种群的原因可能有: 一是气候条件的不同。西双版纳植物园的温度和湿度均高于桂林植物园, 其气候条件更接近狭叶坡垒原始生境。有研究表明, 西双版纳的栽培条件较桂林好, 其栽培的狭叶坡垒生长量为桂林的 2 倍^[16~17]。二是西双版纳植物园迁地保护的狭叶坡垒采用的是小苗, 而桂林植物园采用的是种子繁殖, 采集的种子有可能来自同一株母树, 从而降低了单位引物多态位点比率。

种群间变异是 RAPD 分子水平上遗传变异的主要成分, 研究显示, 63. 41% 的遗传变异存在于种群间, 36. 59% 的遗传

变异存在于种群内, 种群间的基因分化程度较种群内大。此外, 遗传分化系数是反映各亚群间遗传分化的重要指标, 若群体 G_{st} 值在 0 ~ 0. 05 之间, 则表明其各亚群间代表轻度分化; 若 G_{st} 值在 0. 05 ~ 0. 15 之间, 为中度分化; 若 G_{st} 值在 0. 15 ~ 0. 25 之间, 则为高度分化^[18]。本试验结果表明, 2 个迁地保护种群 G_{st} 值为 0. 634 0, 已经发生高度遗传分化, 这可能是因为 2 个迁地保护种群间距离较远, 地理隔离使得种群间较难进行基因交流; 另外, 2 个种群所处的气候、土壤、植被类型等差异较大, 种群可能会因自然生态条件不同产生更大的种群遗传分化。因此, 如果采用选择性标记, 种群遗传分化将会更为明显, 而这些未知的适应性基因在保护遗传学中特别重要^[19]。为了捕获中性标记无法揭示的一些可能存在的选择性基因位点变异, 应进一步开发选择性标记评价狭叶坡垒人工迁地保护种群遗传多样性的保护效果。

参考文献:

[1] 于永福. 中国野生植物保护工作的里程碑[J]. 植物杂志, 1999 (5): 3-11.

[2] 施立明, 贾旭, 胡志昂. 中国的生物多样性现状及其保护对策[M]. 北京: 科学出版社, 1993.

[3] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[4] 汪涛, 赵伟, 李萍, 等. 对甲霜灵不同敏感程度的辣椒疫霉的遗传多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(2): 384-389.

[5] 田赞, 雒新艳, 戴思兰. 菊花芽变和相似品种的 RAPD 分析[J]. 分子植物育种, 2008, 6(6): 1223-1232.

[6] 李丽媛, 李海潮, 何金明. 利用 RAPD 及 AFLP 标记分析部分小茴香品种的遗传多样性[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 46-48.

[7] 吴雪琴, 徐刚标, 梁艳, 等. 南岭地区观光木自然和人工迁地保护种群的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2013, 21(1): 71-79.

[8] 侯万伟, 刘玉皎, 李萍, 等. 12 个蚕豆品种 RAPD 指纹图谱的构建[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 48-50.

[9] 刘曙娜, 于林清, 周延林, 等. 利用 RAPD 技术构建四倍体苜蓿遗传连锁图谱[J]. 草业学报, 2012, 21(1): 170-175.

耿晓东. 微型月季“金太阳”组织培养技术研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 41-43.

微型月季“金太阳”组织培养技术研究

耿晓东

(苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 215008)

摘要:以微型月季品种“金太阳”腋芽为外植体诱导丛生芽, 采用正交设计方案, 进行微型月季初代和继代增殖最优培养基配方的筛选, 结果表明, 微型月季腋芽诱导最适宜培养基是 $1/2MS + 6 - BA \ 1 \text{ mg/L} + NAA \ 0.5 \text{ mg/L} + 3\%$ 蔗糖 $+ 0.6\%$ 琼脂; 丛生芽继代增殖最适宜培养基是 $MS + 6 - BA \ 2 \text{ mg/L} + NAA \ 0.5 \text{ mg/L} + KT \ 0.5 \text{ mg/L} + 3\%$ 蔗糖 $+ 0.6\%$ 琼脂, pH 值为 5.8。

关键词:微型月季; 组织培养; 增殖; 继代

中图分类号:S685.120.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0041-03

微型月季是蔷薇科蔷薇属多年生木本植物, 又称“迷你月季”或“袖珍月季”, 株型矮小紧凑, 花形小巧可爱, 花色丰富, 花期较长, 因具有较强的抗逆性, 便于粗放管理, 所以在园林绿化中应用较为广泛^[1]。微型月季可通过种子、扦插和组培技术进行繁殖, 生产中一般用扦插繁殖较多, 但扦插繁殖成本高, 繁殖系数较低, 难以满足市场大批量的需求。组培技术具有繁殖效率高、周期短、遗传性状稳定、便于管理等优点^[2], 但关于微型月季组织培养的报道较少。因此, 本试验对微型月季的组织培养技术进行相关研究, 以期为规模化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以盆栽微型月季品种“金太阳”为试材, 选取当年生无病虫害、生长健壮的枝条, 取其中部饱满的腋芽为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 初代培养 去掉枝条上的皮刺和叶, 剪取带腋芽茎段 1.0~1.5 cm, 用洗衣粉溶液洗涤浸泡 30 min 后, 用流水冲洗 1 h。外植体冲洗干净后, 在超净工作台内将外植体放入 75%

乙醇中消毒 30 min, 用无菌水冲洗 1 次, 接着使用 0.1% 的氯化汞溶液浸泡处理 8 min, 用无菌水冲洗 5~8 次后接种^[3]。将带腋芽的茎段接种到初代供试培养基上, 试验采用 4 因素 3 水平正交设计^[4], 设计方案详见表 1, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 1 个茎段, 重复 3 次; 培养 15 d 后统计腋芽诱导率。基本培养基设置 3 个水平: MS 、 $1/2MS$ 、 $1/3 \ MS$; $6 - BA$ 设置 3 个水平: 0.5、1、1.5 mg/L; NAA 设置 3 个水平: 0.1、0.3、0.5 mg/L; KT 设置 3 个水平: 0.1、0.2、0.3 mg/L。腋芽诱导率 = 腋芽萌发个数/接种外植体总数 $\times 100\%$ 。

1.2.2 增殖培养 将初代培养的外植体的约 1.5 cm 新芽, 在超净台内用解剖刀从腋芽基部切下, 接种在供试继代增殖培养基内, 每瓶接 1 个新芽, 每个处理接 10 瓶, 重复 3 次。培养 30 d 后统计丛生芽的增殖倍数。试验采用 $L_9(3^4)$ 正交设计^[4], 同初代培养设计。基本培养基设置 3 个水平: MS 、 $1/2MS$ 、 $1/3 \ MS$; $6 - BA$ 设置 3 个水平: 1、2、3 mg/L; NAA 设置 3 个水平: 0.1、0.3、0.5 mg/L; KT 设置 3 个水平: 0.2、0.3、0.5 mg/L。腋芽增殖倍数 = 新芽萌发个数/接种腋芽总数。

1.3 培养条件

在培养室内进行光照培养, 初代培养和增殖培养的条件: 温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度为 2 000 lx, 光照时间为 12 h/d。培养基除了试验设计的影响因子外, 另添加蔗糖 3%、琼脂 0.6%, 用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将培养基 pH 值调整为 5.8, 配制的培养基在 121°C 高温下灭菌 17 min, 放置 1 周后备用^[5]。

收稿日期: 2013-04-15

作者简介: 耿晓东 (1979—), 男, 江苏扬中人, 硕士, 高级工程师、讲师, 从事观赏植物栽培、园林植物应用等方面的教学与研究。Tel: (0512) 66098506; E-mail: gengxiaodong1088@126.com。

[10] 代文娟, 唐文秀, 邓涛, 等. 狭叶坡垒基因组总 DNA 的提取和纯化方法研究[J]. 生物技术通报, 2011(7): 101-105, 116.

[11] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 5269-5273.

[12] 韦霄, 韦记青, 蒋水元, 等. 迁地保护的金花茶遗传多样性评价[J]. 广西植物, 2005, 25(3): 215-218.

[13] 裴颜龙, 邹喻苹. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报[J]. 植物分类学报, 1995, 33(4): 350-356.

[14] 张继益, 董玉琛, 贾继增, 等. 旱麦草属种质资源的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析[J]. 遗传学报, 1999, 26(1): 54-60.

[15] 乔爱民, 刘佩瑛, 雷建军. 芥菜 16 个变种的 RAPD 研究[J]. 植物学报, 1998, 40(10): 915.

[16] 黄仕训, 陈泓, 唐文秀, 等. 狭叶坡垒生物生态学特征及濒危原因研究[J]. 生物多样性, 2008, 16(1): 15-23.

[17] 张玲, 肖春芬, 王坚. 濒危植物狭叶坡垒的迁地保护[J]. 广西植物, 2001, 21(3): 277-280.

[18] Wright S. Evolution and the genetics of population: Variability within and among natural population[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 79-103.

[19] Gauli A, Gailing O, Stefanon V M, et al. Genetic similarity of natural populations and plantations of *Pinus roxburghii* Sarg. in Nepal[J]. Annals of Forest Science, 2009, 66: 703.