

郑艳冰,丛永柱,吴 琼,等. 10 种金发藓科植物 RAPD 分子系统学研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):58-60.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.016

# 10 种金发藓科植物 RAPD 分子系统学研究

郑艳冰<sup>1</sup>, 丛永柱<sup>1</sup>, 吴 琼<sup>1</sup>, 沙 伟<sup>2</sup>

(1. 黑龙江黑河学院, 黑龙江黑河 164399; 2. 黑龙江齐齐哈尔大学, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**摘要:**利用改良 CTAB 法提取 10 种金发藓科 (Polytrichales) 植物基因组 DNA, 利用 RAPD 和分子标记技术对其进行遗传多样性研究。结果表明, 在供试材料中筛选到具有多态性的 RAPD 引物 12 个, 这些 RAPD 引物共扩增出 68 条带, 多态性带 42 条, 多态性条带比率 (PPB) 为 61.76%; 采用 UPGMA 聚类分析, 供试材料分为 2 大类群, 细叶拟金发藓单独聚为 1 类, 其余 9 种植物聚为 1 类。RAPD 和分子标记技术可用于金发藓科植物系统学研究。

**关键词:**金发藓科; RAPD; 系统学; 遗传多样性

**中图分类号:** Q75      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0058-03

金发藓科 (Polytrichales) 为金发藓目中唯一的 1 个科, 全世界共有 19 个属, 其中, *Eopolytrichum* 为 1 个化石属<sup>[1]</sup>。Schofield 保守估计认为金发藓目大约有 370 种<sup>[2]</sup>, 但新近判断认为, 该目实际上的种数不超过 200 种<sup>[3]</sup>。对金发藓科一些属种的分类地位, 不同学者有不同的认识<sup>[4-8]</sup>。吴鹏程等将穗发藓属的主要种类及拟仙鹤藓属和新金发藓属归并入小金发藓属; 将金发藓属中孢蒴口部盖膜呈肉质的种划入拟金发藓属<sup>[9]</sup>。Zouhair 等利用随机扩增引物对金发藓属 6 种植物进行 RAPD 分析, 共获得 166 条多态性 DNA 片段, 根据 RAPD 分子标记结果, 将 6 种植物分为 2 大类群, 即金发藓、拟金发藓和 *P. c. var. perigoniale* 为 1 类, 松叶金发藓、毛尖金发

藓和 *P. strictum* 为 1 类, 第 1 大类中金发藓与拟大金发藓之间的亲缘关系更近一些<sup>[10]</sup>。金发藓科的许多植物在经典分类学上分类地位不清, 且一些分子标记的试验结果与经典分类学结论相悖, 这为金发藓科系统学研究提供了更广阔的空间。本研究采用 RAPD 分析方法, 对金发藓科 10 种藓类植物进行遗传聚类分析, 以期为更好地研究藓类植物的分类地位奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为自然风干的标本及 2012 年采集的新鲜标本, 材料种名、采集地等信息见表 1。

表 1 供试材料信息

编号	种名	采集地	标本凭证号
1	细叶拟金发藓 <i>Polytrichastrum longisetum</i> (Sw. ex Brid.) G. Sm.	丰林保护区 五营河 小兴安岭	沙伟 04002 沙伟 04016 沙伟 04020
2	毛尖金发藓 <i>Polytrichum piliferum</i> Schrad. ex Hedw.	老黑山	郑艳冰 12009
3	松叶金发藓 <i>Polytrichum juniperinum</i> Hedw.	老黑山	郑艳冰 12005
4	台湾拟金发藓 <i>Polytrichastrum formosum</i> (Hedw.) G. Sm.	小兴安岭 大兴安岭	沙伟 04008 沙伟 99170
5	硬叶小金发藓 <i>Pogonatum neesii</i> (C. Muell.) Dozy	东北	沙伟 175
6	拟金发藓 <i>Polytrichastrum alpinum</i> (Hedw.) G. Sm.	老黑山	郑艳冰 124018
7	多形拟金发藓 <i>Polytrichastrum ohioense</i> (Ren. et Card) G. Sm.	丰林保护区	沙伟 04026
8	小仙鹤藓 <i>Atrichum crispulum</i> Schimp. ex Besch.	五营河 都江堰	沙伟 04004 汪楣芝 57315
9	小胞仙鹤藓 <i>Atrichum rhystophyllum</i> (C. Muell.) Par.	丰林保护区 丰林公园	沙伟 04022 沙伟 04023
10	细疣小金发藓 <i>Pogonatum dentatum</i> (Brid.) Brid.	大兴安岭 长白山	沙伟 99011 沙伟 20381

### 1.2 仪器及药品

1.2.1 仪器 美国产 PE-9600 型 PCR 仪; 北京六一仪器厂产 DY-3 型电泳仪和 DYCP-33A 型水平板电泳槽; 日本产

7A0-0012 型 Gene Spec1、SANYO 制冰机和 NUALR-6382E 型超低温冰箱; 河北省黄骅航天仪器厂产 DZKW-D 型水浴锅; 德国产高速冷冻离心机 HERMLE Z323K; 1 mL 和 20、200、100  $\mu$ L 微量加样器; UVP GDS-8000 型紫外凝胶成像系统; Barnstead 纯水仪; PHS-25 型酸度计; 北京赛多利斯天平有限公司产电子天平。

1.2.2 药品 Tris、HCl、EDTA、NaOH、溴化乙锭 (EB)、乙酸钠、冰乙酸、TE、CTAB、NaCl、TBE、乙醇、氯仿、异戊醇、溴酚蓝、蔗糖、抗坏血酸钠、PVP 和 3%  $\beta$ -巯基乙醇等, 均为分析

收稿日期: 2014-02-14

基金项目: 黑龙江省教育厅科技项目 (编号: 12531437)。

作者简介: 郑艳冰 (1976—), 女, 黑龙江黑河人, 硕士, 副教授, 主要从事植物遗传学研究。Tel: (0456) 6842168; E-mail: yanbing-zheng1234@163.com。

纯(AR);4种dNTP、*Taq* DNA聚合酶及A、B、C、D、H、Y组引物,均为上海生工生物工程股份有限公司产品;DGL 2000 Marker,为大连宝生物公司产品。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 DNA提纯、保存及检测** 采用改良CTAB法提取试材DNA;放入-20℃冰箱储存或放入4℃冰箱待用;利用核酸检测仪通过紫外吸收法对DNA样品进行定量分析和纯度检测,并用琼脂糖电泳检测DNA。

#### 1.3.2 RAPD扩增

**1.3.2.1 扩增反应体系** RAPD扩增体系总体积为25 μL,其中,10×buffer、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、10 mmol/L each dNTP、25 g/L TemplateDNA、5 000 U/mL *Taq* polymerase 和10 mmol/L Primer等组分体积分别为2.5、2.0、1.0、1.0、0.3、0.8 μL,用无菌ddH<sub>2</sub>O补足。

**1.3.2.2 扩增反应程序** 94℃ 2 min;94℃ 1 min,36℃ 1 min,72℃ 2 min,43个循环;72℃ 5 min,1个循环。

**1.3.2.3 RAPD反应体系的优化** RAPD反应体系为25 μL,扩增引物为A11。针对反应体系中模板DNA、dNTP、引物和*Taq*酶浓度等4个组分,L<sub>16</sub>(5<sup>4</sup>)正交试验基础上进一步进行L<sub>9</sub>(4<sup>3</sup>)正交设计(表2、表3),以寻求最优方案。

表2 各组分浓度水平

水平	模板 DNA (ng)	dNTP (mmol/L)	<i>Taq</i> 酶 (U)	引物 (mmol/L)
1	15	0.3	1.5	0.3
2	20	0.4	2.0	0.4
3	25	0.5	2.5	0.5

表3 L<sub>9</sub>(4<sup>3</sup>)正交试验的因素和水平处理组合

组合	模板 DNA (ng)	dNTP (mmol/L)	<i>Taq</i> 聚合酶 (U)	引物 (mmol/L)
1	1(15)	1(0.3)	1(1.5)	1(0.3)
2	1(15)	2(0.4)	2(2.0)	2(0.4)
3	1(15)	3(0.5)	3(2.5)	3(0.5)
4	2(20)	1(0.3)	3(2.5)	2(0.4)
5	2(20)	2(0.4)	1(1.5)	3(0.5)
6	2(20)	3(0.5)	2(2.0)	1(0.3)
7	3(25)	1(0.3)	2(2.0)	3(0.5)
8	3(25)	2(0.4)	3(2.5)	2(0.4)
9	3(25)	3(0.5)	1(1.5)	1(0.3)

**1.3.4 扩增产物的检测** 扩增结束,在反应混合物中加入5 mL/L上样缓冲液,混匀;取15 μL点入1.5%琼脂糖凝胶中,用0.5×TBE电泳缓冲液在3 V/cm(84 V)电场下电泳2~3 h,经0.25 mg/L溴化乙锭染色30 min,在紫外凝胶成像系统下观察照相和分析。

**1.3.5 引物筛选** 正式扩增前,任意选取系统进化差异较大的2个不同品种DNA,以这2个品种均能扩增出清晰条带、重复性和多态性好的为引物选择依据,对上海生工生产的A、B、C、D、H、Y组共6组随机引物进行筛选。

**1.3.6 数据处理** 在筛选出的引物中,选取扩增清晰、稳定、重复性好的引物进行条带统计。电泳获得基因组扩增图谱的每1条带(DNA片段)均为1个分子标记,并代表引物的1个结合位点;根据各分子标记在相同电泳迁移率的有无,统计得到所有位点的二元矩阵,有DNA扩增带(显性)记为“1”,无带记为“0”,强带或可分辨的弱带赋值均为“1”;用NTSYS-

PC软件处理RAPD数据,依据NEI-LI法计算各品种间的遗传相似度,按照类平均法(UPGMA)建立亲缘关系树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD反应体系优化

在L<sub>9</sub>(4<sup>3</sup>)正交试验设计中,组合1、3扩增出2条带,组合2扩增出4条带,组合5扩增出1条带,其余组合未扩增出条带;组合2的多态性及清晰度最好,最佳RAPD扩增反应条件为反应总体积25 μL、dNTP为0.4 mmol/L、引物为0.4 mmol/L、基因组DNA为15 ng、*Taq*酶2.0 U,其他成分为无菌ddH<sub>2</sub>O。

### 2.2 引物筛选

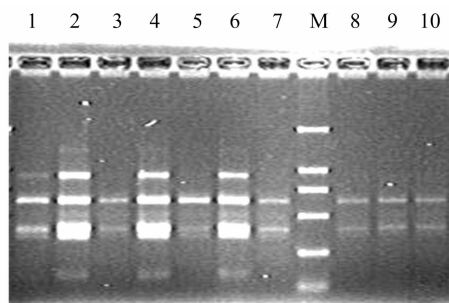
利用优化反应体系对上海生工生物工程股份有限公司生产的A、B、C、D、H、Y组120条引物进行筛选,共筛选出12条多态性好的引物(表4),用于全部供试样品DNA的扩增。

表4 筛选出的引物及其序列

引物	序列	引物	序列
SBSA-02	TGCCGAGCTG	SBSD-11	AGCGCCATTG
SBSA-10	GTGATCGCAG	SBSH-03	AGACGTCCAC
SBSB-08	GTCCACACGG	SBSH-19	CTGACCAGCC
SBSC-02	GTGAGCCGTC	SBSH-20	GGGAGACATC
SBSC-05	GATGACCGCC	SBSY-04	GGCTGCAATG
SBSD-08	GTGTGCCCCA	SBSY-06	AAGGCTCACC

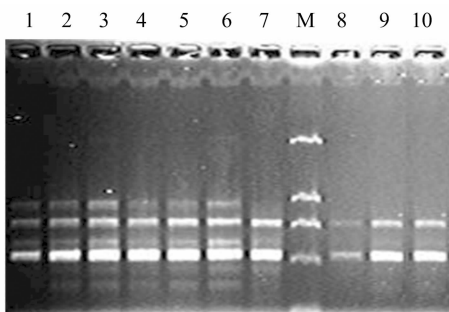
### 2.3 扩增结果

选用重复性和多态性较好、谱带清晰的12条引物对4属10种金发藓科植物样品进行RAPD扩增,结果由图1、图2、图3和表5可见,每个引物的扩增片段在2~9条之间;12个随机引物共获得68条谱带,即共检测到68个位点,平均每个引物检测到5.67个位点,其中,多态性条带为42条,多态百分率为61.76%。



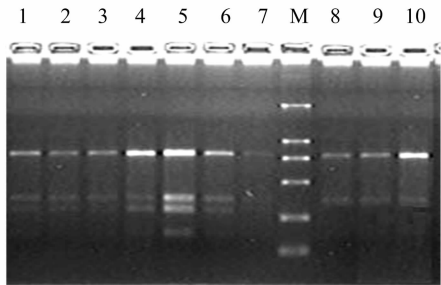
泳道由左至右顺序与表1品种名称顺序相同;M—marker

图1 SBSD-08引物RAPD扩增结果



泳道由左至右顺序与表1品种名称顺序相同;M—marker

图2 SBSD-11引物RAPD扩增结果



泳道由左至右顺序与表1品种名称顺序相同；M—marker

图3 SBSH-03 引物 RAPD 扩增结果

2.4 聚类分析

基于 RAPD 扩增结果,用 UPGAM 法进行聚类分析,得到供试材料相似性系数表和 10 种金发藓科植物系统学关系树状图。由表 6 和图 4 可见,10 种金发藓科植物的遗传相似性系数在 0.02 ~0.96 之间,说明这 10 种植物亲缘关系较近;细叶拟金发藓与其他种遗传距离较远,自为 1 类,其余 9 种聚为 1 类;其他 9 种植物的遗传相似性系数在 0.64 处又可分 2 两类,即硬叶小金发藓和细疣小金发藓聚为 1 类,其余 7 种聚为

表 5 12 个引物对 10 个供试材料的扩增结果

引物	扩增带数 (条)	多态带数 (条)	多态带百分率 (%)
SBSA -02	7	7	100.00
SBSA -10	5	4	80.00
SBSB -08	9	5	55.56
SBSC -02	9	6	66.67
SBSC -05	2	2	100.00
SBSD -08	8	6	75.00
SBSD -11	6	2	33.33
SBSH -13	5	2	40.00
SBSH -19	4	1	25.00
SBSH -20	6	3	50.00
SBSY -04	5	3	60.00
SBSY -06	2	1	50.00

1 类;这 7 种植物在遗传相似性系数 0.78 处又可聚为 2 类,即小仙鹤藓和小胞仙鹤藓聚为 1 类,台湾拟金发藓、拟金发藓、多形拟金发藓、毛尖金发藓和桧叶金发藓聚为 1 类。这说明 10 种金发藓科植物遗传相似性极高,与形态解剖学及其形态分类学地位表现出高度的一致性,这也与 Hyvönen 等结论<sup>[3,11]</sup>相一致。

表 6 10 种金发藓科植物 RAPD 遗传相似度

材料编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000 0									
2	0.017 9	1.000 0								
3	0.017 9	0.910 7	1.000 0							
4	0.017 9	0.767 9	0.714 3	1.000 0						
5	0.017 9	0.660 7	0.678 6	0.678 6	1.000 0					
6	0.017 9	0.750 0	0.696 4	0.946 4	0.732 1	1.000 0				
7	0.017 9	0.785 7	0.803 6	0.839 3	0.803 6	0.821 4	1.000 0			
8	0.017 9	0.803 6	0.785 7	0.714 3	0.571 4	0.696 4	0.767 9	1.000 0		
9	0.017 9	0.732 1	0.678 6	0.821 4	0.678 6	0.767 9	0.803 6	0.714 3	1.000 0	
10	0.017 9	0.660 7	0.607 1	0.678 6	0.928 6	0.696 4	0.803 6	0.607 1	0.750 0	1.000 0

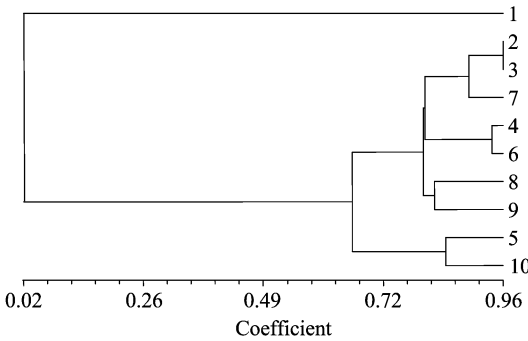


图4 10种金发藓科植物 RAPD 标记的 UPGMA 聚类图

参考文献:

[1]Konopka A S, Herendeen P S, Merrill G L, et al. Sporophytes and gametophytes of polytrichaceae from the campanian (late cretaceous) of Georgia, USA [J]. International Journal of Plant Sciences, 1997, 158(4): 489 - 499.

[2]Buck W R. Introduction to bryology [J]. Brittonia, 1986, 38(1): 94 - 95.

[3]Hyvönen J, Hedderson T A, Merrill G L, et al. On phylogeny of the

polytrichales [J]. The Bryologist, 1998, 101(4): 489 - 504.

[4]Smith G L. Conspectus of the genera of Polytrichaceae [M]. New York: Memoirs of the New York Botanical Garden, 1971.

[5]Abolin A A. Polytrichum strichum (Polytrichaceae)—an original species of mordificant P. junipericum [J]. Bot Zum, 1983, 70(10): 1503 - 1511.

[6]Schriebl A. Culture experiments on the moss genus Polytrichum [J]. Journal of Hattori Botanical Laboratory, 1982, 53(2): 157 - 158.

[7]Smith M G L. Notes on asiatic Polytrichaceae I, II [J]. Memoirs of the New York Botanical Garden, 1987, 45: 419 - 425.

[8]Smith M G L. Notes on North American Polytrichaceae: Polytrichastrum [J]. The Bryologist, 1992, 95(3): 270 - 273.

[9]吴鹏程, 贾 渝. 中国苔藓志: 第八卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.

[10]Zouhair R, Corradini P, Defontaine A, et al. RAPD markers for genetic differentiation of species within Polytrichum (Polytrichaceae, Musci): a preliminary survey [J]. Taxon, 2000, 49(2): 217 - 229.

[11]Hyvönen J, Koskinen S, Merrill G L, et al. Phylogeny of the polytrichales (bryophyta) based on simultaneous analysis of molecular and morphological data [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 31(3): 915 - 928.