

粤西地区几种常见榕属植物的 RAPD 分析

黄永莲, 杨秀坚 (广东湛江师范学院, 广东湛江 524048)

摘要 [目的] 从 DNA 水平揭示整个榕属植物的分类及系统发育规律。[方法] 应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术, 对粤西地区常见榕属植物进行基因组 DNA 多态性分析。[结果] 结果表明, 榕属植物多态性占 72.93%, 显示出榕属植物丰富的遗传多样性。[结论] RAPD 技术可以从分子水平鉴定榕属植物品种, 揭示榕属植物种质资源的亲缘关系以及遗传背景, 为榕属植物的栽培育种及资源的合理保护提供科学依据。

关键词 榕属植物; RAPD; 亲缘关系; 遗传多样性

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)15-06214-02

RAPD Analysis of Several Familiar Ficus Plant in the Western Guangdong

HUANG Yonglian et al (Zhanjiang Normal College, Zhanjiang, Guangdong 524048)

Abstract [Objective] The classification and phyletic evolution rule of the Ficus plant was revealed at DNA level. [Method] The polymorphism of genomic DNA of some familiar Ficus Plants in the western Guangdong were analyzed with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technology. [Result] The results showed that the polymorphism of the Ficus plants was 72.93%, and the Ficus plants had abundant genetic diversity. [Conclusion] RAPD technology can identify Ficus plant varieties at the molecular level and reveal the relationship and the genetic background of Ficus plant idioplasm resources, at the same time, it can also provide a scientific basis for the cultivation, breeding and the reasonable protection of Ficus plant.

Key words Ficus plant; RAPD; Relationship; Genetic diversity

榕属 (*Ficus*) 植物隶属于桑科 (Moraceae), 是重要的观赏植物, 全球共 800 余种, 我国约有 98 种, 主要分布在热带、亚热带地区。榕树的很多种类具有“盘根现象”、“绞杀现象”, 树冠大而多姿, 能形成空中花园, 景观奇特雄伟^[1]。长期以来, 关于榕属植物遗传多样性的研究主要集中在形态学、生理学、细胞学以及同工酶的研究上。榕属植物的分类主要依据叶形、隐头花序、花梗、雌雄花等形态学方面的特征, 具有相当大的局限性^[2], 分子标记技术的不断成熟为遗传资源的

鉴定分类和进化起源等的研究提供了一个更为准确和可靠的方法。因此, 利用 RAPD 标记弥补传统研究方法的不足, 从 DNA 水平揭示整个榕属植物的分类及系统发育规律是十分必要的。

1 材料与方法

1.1 材料 粤西地区湛江寸金公园和南亚植物园的 6 种榕属 (*Ficus*) 植物嫩叶 (表 1)。

表 1 试验材料的编号与来源

Table 1 Number and sources of experimental materials

编号 No.	实验材料 Experimental materials	地点 Sites	采集株数 株 Sampling number	时间 Date	凭证标本 Voucher
S ₁	笔管榕 (<i>F. vightiana</i> Will.)	广东湛江寸金公园 Guzhin Garden in Zhanjiang of Guangdong Province	10	2007-03	LWR2004050814
S ₂	梨果榕 (<i>F. pyrifera</i> HbK. et Arn.)	南亚植物园 South Asia Botanical Garden	10	2007-03	LWR2004050811
S ₃	小叶榕 (<i>F. microcarpa</i> Var <i>pusillifolia</i>)	南亚植物园 South Asia Botanical Garden	10	2007-03	LWR2004050815
S ₄	黄葛树 (<i>F. lacor</i> Buch-Ham)	广东湛江寸金公园 Guzhin Garden in Zhanjiang of Guangdong Province	10	2007-03	LWR2004050807
S ₅	对叶榕 (<i>F. benjamina</i> L)	南亚植物园 South Asia Botanical Garden	10	2007-03	LWR2004050809
S ₆	高山榕 (<i>F. altissima</i> B)	广东湛师校园 Campus of Zhanjiang Normal University in Guangdong	10	2007-03	LWR2004050817

注: 凭证标本依据文献 [3-4]。

Nte: Voucher was accorded to references [3-4].

1.2 方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取^[5-6]。取榕树嫩叶 5 g 于研钵中, 加入液氮快速研磨成粉末后转移到离心管中, 同时加入适量蛋白酶 K, 用力摇匀。60℃ 水浴 1 h, 每隔 15~20 min

颠倒混匀, 然后室温放置 10 min, 其间摇动 1~2 次。10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至新管, 加 Tris 饱和酚至满管, 颠倒混匀。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液移至新管, 加氯仿: 异戊醇 (V: V=24: 1) 至满管, 颠倒混匀, 重复 2~3 次。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液移至新管, 先加 1/10 体积 4℃ 预冷的 3 mol/L 醋酸钾, 再加 4℃ 预冷的异丙醇至满管, 将离心管轻轻颠倒混匀几次, 4℃ 放置 10 min 以上。10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次, 再用无水乙醇洗涤 1 次。风干后, 加 50 μl TE 液溶解,

基金项目 广东省自然科学基金项目 (5011730); 湛江师范学院科学研究基金项目 (L0607)。

作者简介 黄永莲 (1962-), 女, 重庆人, 实验师, 从事分子生物学实验技术研究。

收稿日期 2008-02-26

电泳检测。

1.2.2 PCR 扩增。 PCR 扩增反应条件为:20 μ 反应体积;1 \times Taq 酶 buffer (Sangon 公司); 约 2 ~ 4 ng 模板 DNA; 2.0 mmol/L MgCl₂; 200 μ mol/L dNTP (Sangon 公司); Taq 酶 1 个单位 (Sangon 公司); 15 ng/20 μ 引物 (Operon 公司)。空白对照用三蒸水代替模板 DNA, 其余的成分不变。PCR 扩增按下述程序进行: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 一个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min 35 $^{\circ}$ C 2 min 72 $^{\circ}$ C 2 min, 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min 一个循环。PCR 扩增完

成后, 取 15 μ 扩增产物点样于 = 1 % 琼脂糖凝胶上, 在 1 \times TAE 缓冲液中电泳、稳压 (4 v/cm), 电泳约 2.5 h, 2 Kb ladder DNA 用作分子量标记。凝胶成像系统观察。

2 结果与分析

2.1 多态性分析 用 6 个不同引物对 6 种不同榕属植物进行 PCR 扩增, 结果表明, 不同的引物所扩增的条带数不同; 同一引物不同种植物扩增的条带数也不相同。多态性带占总数的 72.93 %, 表现出榕属植物丰富的遗传多样性 (表 2)。

表 2 6 种榕属植物扩增结果

Table 2 Amplification results of 6 kinds of Ficus plants

材料编号 Material No.	引物 Primer	DNA 序列 (5'~3') DNA sequence	总条带条 Total bands	多态性条带 Polymorphism bands	条多态性 Polymorphism	% 单态性条带 Monomorphic bands	条单态性 Monomorphism	% 特异条带 Special bands	条 Speciality	% 特异性 Speciality
S ₁	I ₁	5 ACCTGGACAC 3	7	7	100.0	0	0	2	28.6	
S ₂	J ₂₀	5 AAGCGCCCTC 3	7	3	42.9	4	57.1	0	0	
S ₃	J ₆	5 TCGITCCGCA 3	9	8	88.9	1	11.1	5	55.6	
S ₄	L ₁₁	5 ACGATGAGCC 3	6	5	83.3	1	16.7	0	0	
S ₅	I ₁₁	5 ACATGCCGTG 3	8	5	62.5	3	37.5	1	12.5	
S ₆	I ₂₀	5 AAAGTCCGCG 3	5	3	60.0	3	40.0	0	0	
平均合计 Average total			7	5	72.9	2	27.0	1	16.1	

2.2 亲缘关系分析 在电泳图谱上每一 DNA 片段被看作一个可区分的分子标记, 同一标记位点有带者 (包括强带和弱带) 记作 1, 缺乏记作 0, 选取长度在 200 ~ 2000 bp 并且可重复的 DNA 带记录待分析。各个样品间的相似性系数采用如下公式^[7] 计算: $F = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$ (式中, N_x 和 N_y 分别为群体 x 和 y 的扩增多态 DNA 片断数; N_{xy} 为两群体间相同的片段数); 遗传距离采用下列公式^[7] 计算: $D = 1 - F$ (D 为遗传距离, F 为相似性系数)。采用 Phylip3.6 软件, 选用 UPGMA 法对所求得的相似性系数和距离系数矩阵进行聚类分析 (表 3)。

也存在与经典分类学结论不完全吻合的。梨果榕是灌木植物, 与其他几种乔木植物的形态有较大差异, 但试验结果分类不明显, 可能是由于在提取总 DNA 的过程中材料所含酚类物质太多, 提取 DNA 的质量受到影响, 这还需要进一步的探讨。

表 3 6 种榕属 (Ficus) 植物相似性系数 (上) 及距离系数 (下)

Table 3 Similarity coefficient (above) and distance coefficient (below) of 6 kinds of Ficus plants

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
S ₁		0.547 6	0.523 8	0.595 2	0.452 4	0.500 0
S ₂	0.452 4		0.499 9	0.523 8	0.333 3	0.481 6
S ₃	0.476 2	0.500 1		0.523 5	0.357 1	0.452 4
S ₄	0.404 8	0.476 2	0.476 5		0.357 2	0.523 7
S ₅	0.547 6	0.666 7	0.642 9	0.642 8		0.433 3
S ₆	0.500 0	0.518 4	0.547 6	0.476 3	0.566 7	

注: 表 3 中对角线以上为 F 值 (相似性系数), 对角线以下为 D 值 (距离系数), 相似性系数从 0.333 3 ~ 0.595 2, 距离系数从 0.404 8 ~ 0.666 7。

Nte: Diagonal above in Table 3 is F value, diagonal below is D value. Similarity coefficient is from 0.333 3 to 0.595 2; distance coefficient is from 0.404 8 to 0.666 7.

由表 3 可知, 不同种植物之间具有差异性, 笔管榕和黄葛树之间的相似性系数最大, 为 0.595 2; 距离系数最小, 为 0.404 8, 说明笔管榕和黄葛树亲缘关系最近。对叶榕和梨果榕之间相似性系数最小, 为 0.333 3; 距离系数最大, 为 0.666 7, 说明对叶榕和梨果榕之间亲缘关系最远, 分析结果与这几种榕属植物的形态特征吻合^[8-9] (图 1)。

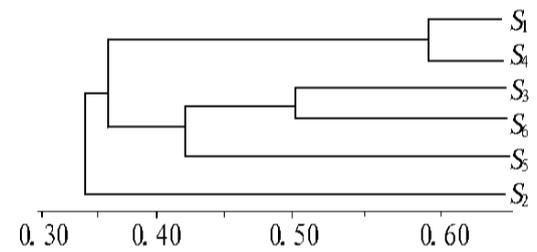


图 1 6 种榕属植物 RAPD 聚类分析

Fig.1 RAPD cluster analysis diagram of 6 kinds of Ficus plants

3 结论

物种的遗传多样性是大自然最珍贵的资源, 是人类赖以生存的基础。一个物种的进化潜力和抵御逆境的能力取决于种内遗传变异的大小, 遗传多样性越丰富, 对环境变化的适应能力越强。榕属植物有丰富的遗传多样性, 所以榕属植物对环境变化的适应能力强, 寿命较长而且景观奇特雄伟, 成为重要的观赏植物^[10-11]。从分子生物学水平对榕属植物进行分类及系统发育的研究, 可为我国榕属植物种质资源的合理评价、有效保护和持续利用提供重要的科学依据。

参考文献

[1] 袁长春, 李伍荣, 丁利明, 等. 基丁形态学特征探讨榕属部分植物的系统发育[J]. 湛江师范报, 2004, 25(6): 26-31.
 [2] 邹喻苹, 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: 9-29.
 [3] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴: 第 1 册[M]. 北京: 科技出版社, 2001: 483-500.
 [4] 中国科学院华南植物研究所. 广东植物志[M]. 广州: 广东科技出版社, 1987: 186-214.
 [5] 肖小河, 刘峰群, 史成和, 等. 国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中草药, 2000, 31(3): 201-212.
 [6] 荆玉祥, 匡延云, 李德葆. 植物分子生物学—成就与前景[M]. 北京: 科学出版社, 1995.

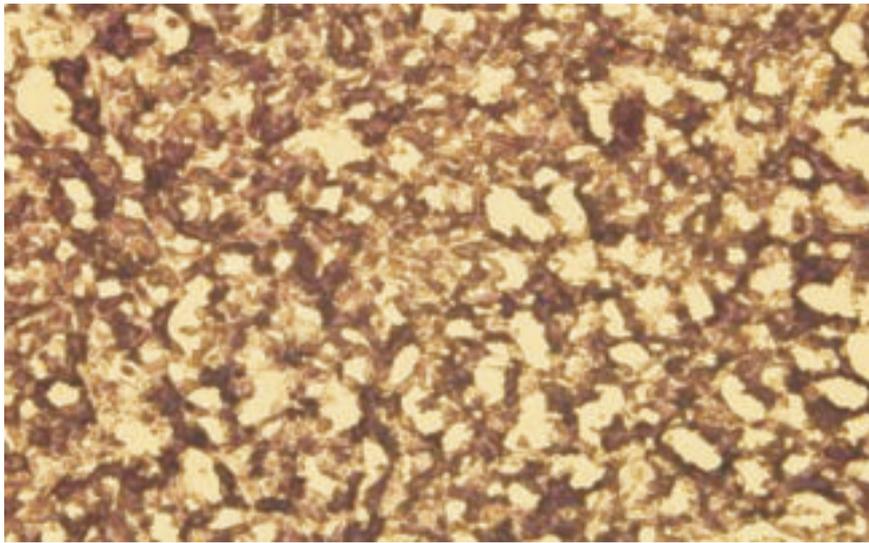


图12 小梅山猪垂体免疫组化对照

Fig.12 Negative control of immunohistochemistry in pituitary of small Mishan pig

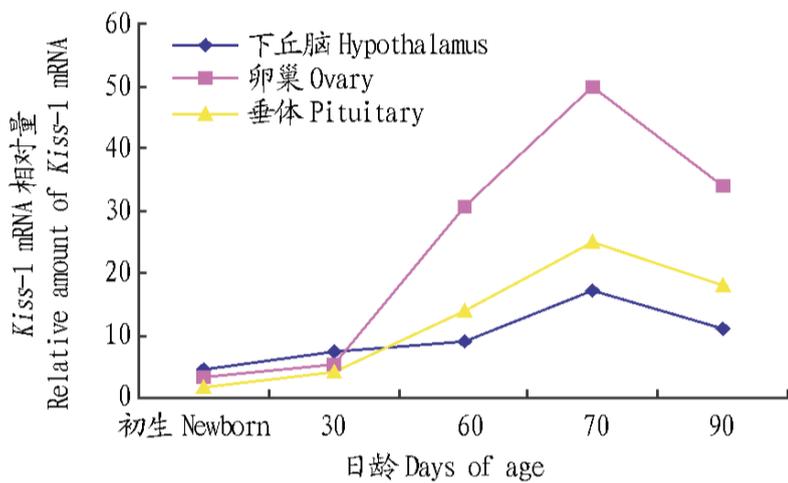


图13 Kiss-1 mRNA 在小梅山猪下丘脑-垂体-卵巢各时期的相对表达丰度

Fig.13 The expression abundance of Kiss-1 mRNA in hypothalamus - ovary - pituitary of small Mishan pig

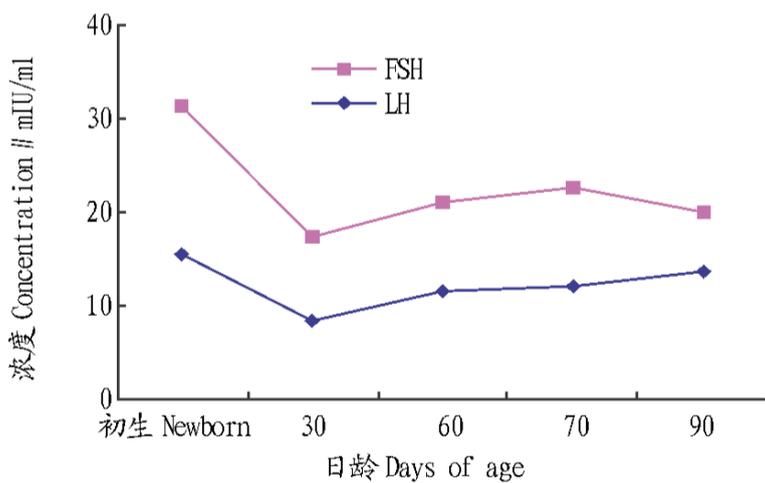


图14 小梅山猪初生~90日龄LH和FSH浓度变化

Fig.14 Concentration changes of LH and FSH of small Mishan pig from newborn to 90 d

龄开始出现3级卵泡之前其血清LH浓度出现上升^[13],而笔者的试验也有类似现象,初步认为此阶段的LH浓度上升对促进腔前卵泡向有腔卵泡发育转变具有重要意义,因为在60日龄之前的母猪卵巢切片上几乎很难观察到3级卵泡。

由该试验可得出,若排除出生前机体自身激素水平过高的因素,Kiss-1 mRNA在各日龄的表达丰度与血浆LH和FSH水平相似并呈显著相关($r = 0.793, 0.320$),说明Kiss-1 mRNA对LH和FSH的调节主要发生在转录水平,同时Kiss-1 mRNA水平与初情期前后性激素分泌水平具有相似周期变化规律。可见,Kiss-1 mRNA对猪生殖激素具有一定调控作用。

据此可认为,Kiss-1基因在猪初情期的下丘脑-垂体-卵巢轴推动了其初情期的启动,维持其生殖功能,在雌性中枢神经系统生殖调控中起到关键作用,是控制猪初情期启动的关键因子。

参考文献

- [1] LEE J H, MELE ME, HICKS DJ, et al. Kiss-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(23): 1731 - 1737.
- [2] 顾耀宗. 小梅山猪近年来选育效果观察 [J]. *畜牧与兽医*, 1995, 27(1): 17 - 19.
- [3] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 358 - 365.
- [4] NAVARRO V M, CASTELLANO J M, FERNANDEZ FERNANDEZ R, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of Kiss-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of Kiss-1 peptide [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(10): 4565 - 4574.
- [5] SHAHAB M, MASTRONARDI C, SEMINARAS B, et al. Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6): 2129 - 2134.
- [6] BRALDIUG C, DUNS L, OHSAWA M, et al. Kiss-1 expression and melanin-like immunoreactivity in the rat brain [J]. *J Comp Neurol*, 2005, 481(3): 314 - 329.
- [7] HTELOUD N, ACIERNO J S, JR ASTRID U, et al. Reversible Kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anorexia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(3): 1317 - 1322.
- [8] SHAHAB M, MASTRONARDI C, STEPHANE B, et al. Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates [J]. *PNAS*, 2005, 102(6): 2129 - 2134.
- [9] FUNESS, HEDRICK J A. The Kiss-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system [J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 2003, 312(4): 1357 - 1363.
- [10] PRUNER A, CHOINEAU M, MOUNER A M, et al. Patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and androgens from birth to the first estrous cycle in Mishan gilts [J]. *Reprod Fert*, 1993, 98: 313 - 319.
- [11] LUIZ J B, RAMPACEK G B, KRAEILING R R, et al. Serum LH and estrogen profiles before puberty in the gilt [J]. *J Anim Sci*, 1984, 58(3): 686 - 691.
- [12] 周双海, 陈清明, 李振宽, 等. 天津白母猪发育过程中生殖激素变化规律 [J]. *中国农业大学学报*, 2001, 6(5): 5 - 8.
- [13] PRESSING A L. Patterns of LH secretion associated with the appearance of surface follicles in the prepubertal pig [J]. *J Anim Sci*, 1990, 68(S1): 456.
- [9] 刘石泉, 余庆波, 李小军, 等. 霍山石斛种内遗传稳定性的RAPD初探 [J]. *中草药*, 2005, 36(3): 427 - 431.
- [10] 王玉柱, 孙浩元, 杨丽, 等. 杏属植物种间亲缘关系的RAPD分析 [J]. *中国农学通报*, 2006, 22(5): 53 - 56.
- [11] 蒋谦才, 黄悦朝, 李增祥. 广东榕属观赏植物资源及其开发利用 [J]. *热带植物科学*, 2004, 33(4): 48 - 51.

(上接第6215页)

- [7] 钟扬, 陈家宽, 黄德世. 数量分类的方法与程序 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1990: 35 - 81.
- [8] 陆嘉惠, 李学禹, 马森, 等. 国产甘草属植物的RAPD分析及其分类学研究 [J]. *西北植物学报*, 2006, 26(3): 527 - 531.