

文章编号: 100F 1498(2003) 06 0655 06

# 撑篙竹遗传变异的 RAPD 分析\*

邢新婷, 傅懋毅, 费学谦, 姜景民

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 采用随机扩增多态 DNA(RAPD) 方法对 6 个群体 30 丛撑篙竹个体进行了遗传变异的研究。28 个随机引物共检测到 173 个位点, 其中 85 个是多态位点, 平均每个引物提供 6.18 个 RAPD 信息量, 扩增出的 DNA 片段大小一般在 200~ 2 000 bp 范围之间; 用 POPGENE 1.31 版软件进行遗传多样性分析: 平均  $Ne\Gamma s$  基因多样性为 0.211 4, Shannon's 信息指数为 0.327 7, 基因分化系数 0.185 3, 表明群体间有一定的分化; 各群体平均遗传距离 0.035 0, 表明群体亲缘关系较近; 试用 UPGMA 方法对不同产地的撑篙竹群体作聚类分析, 初步可将 6 个群体聚为 3 类。

关键词: 撑篙竹; RAPD; 竹类群体; 遗传变异

中图分类号: S795 文献标识码: A

撑篙竹(*Bambusa pervariabilis* McClure) 主要分布于广东、广西等地的丘陵山麓及平原河滩的疏松、肥沃沙质土壤上, 海南、福建也有分布。其竹秆挺直, 竹壁厚而坚韧, 可作棚架、撑篙、农具、家具及建筑用材, 是我国华南地区人工栽培的重要用材竹种之一。

近年来, 竹类植物的遗传多样性及分子系统学研究已有不少报道<sup>[1~3]</sup>。在各种 DNA 分子标记中, 随机扩增多态性 DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 技术可以在对物种没有任何分子生物学研究的情况下, 对其 DNA 片段进行多态性分析, 因此在竹类植物群体遗传结构、多样性和系统分类、进化研究中具有独特的优势<sup>[4~10]</sup>。本文从保护生物多样性的角度, 利用 RAPD 分子标记技术对 6 个产地的撑篙竹群体进行遗传多样性分析, 为进一步开展撑篙竹种质资源的收集、保存、评价和利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

供试撑篙竹取自广东增城、怀集、封开、高州和广西桂林、南宁, 根据分子标记取样要求以及实验室的经验采集了 6 个产地 30 丛的叶片, 每一产地 5 丛, 每一丛各取 10 g 新鲜嫩叶片, 除去灰尘等杂物和露珠, 然后密封于干燥硅胶瓶中带回实验室备用。

### 1.2 撑篙竹 DNA 提取

采用 SDS 方法提取 DNA<sup>[11]</sup>, 并略加修改。

收稿日期: 2003 05 12

基金项目: 国家林业部指南项目“竹类植物遗传多样性和遗传连锁图谱的构建”(项目编号 190)

作者简介: 邢新婷(1972—), 女, 河北藁城人, 博士。

\* 本实验得到了亚热带林木培育实验室吴开云老师的指导, 特致谢意!

### 1.3 RAPD 分析

试验在亚热带林木培育实验室进行。10 碱基随机引物和琼脂糖均购自上海生物工程公司, 反应缓冲液、Taq 酶、dNTP 以及标准 DNA 均购自上海华美生物工程公司。PCR 反应在美国 PE 公司生产的 GeneAmp PCR System PE9600 DNA 扩增仪上进行。先优化反应条件直至扩增带数清晰重复性好为止。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  10 倍反应缓冲液, 模板含量为 50 ng, 1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Mg}^{2+}$ , 1.2 U 的 Taq 酶, dNTP 为 1.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 引物浓度为 3.75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min  $\rightarrow$  [94  $^{\circ}\text{C}$  1 min  $\rightarrow$  37.5  $^{\circ}\text{C}$  1 min  $\rightarrow$  72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 20 s] 40 个循环  $\rightarrow$  72  $^{\circ}\text{C}$  8 min  $\rightarrow$  4  $^{\circ}\text{C}$  保持。扩增后的产物按常规的方法在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离产物, 电泳和制胶缓冲液用 0.5 倍的 TBE。于紫外灯下观察拍照。

### 1.4 数据处理及分析

将每个清晰可重复的 DNA 电泳带记录下来并将其作为一个位点, 带谱按 1/0 标记, 若某个扩增产物在一个样品中出现就记作“1”, 未出现记作“0”。利用 POPGENE1.31(Tools for Population Genetic Analysis) 软件(version 1.31) 进行数据的遗传分析, 计算群体间的遗传距离、相似系数、有效等位基因数  $N_e$ , 基因多样性  $H$  和 Shannon 信息指数  $I$ 、基因分化系数  $G_{st}$ ; 基于地理群体间  $Nei's^{[12]}$  无偏遗传距离(Unbiased Genetic Distance) 估算, 用非加权成组配对法(UPGMA) 对 6 个群体进行聚类分析。

## 2 结果与分析

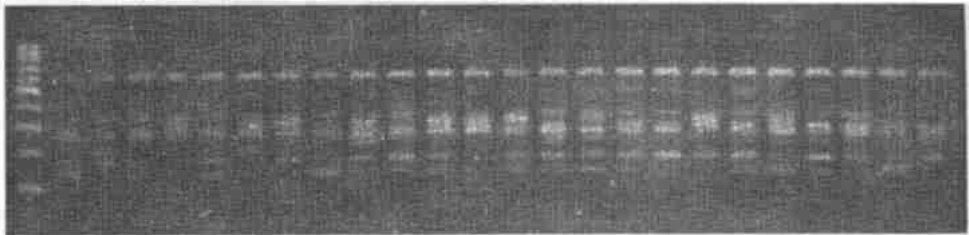
### 2.1 引物筛选

采用预备试验中所确立的 PCR 扩增程序, 各群体随机选取 1 丛提取的 DNA 共计 6 个模板, 从 112 个随机引物中筛选了 28 个扩增条带清晰、具多态的引物用于所有模板的扩增, 并对 28 个引物的扩增结果进行了 RAPD 分析。表 1 列出了 28 个引物的序列及扩增的位点。根据胶板梳孔数, 每个群体有 4 个个体, 因此图 1 和图 2 列举了 S32 和 S37 两个引物对 6 个群体 24 个个体扩增的单态和多态标记。

表 1 28 个 RAPD 引物在 6 个撑篙竹地理群体中扩增出的 DNA 片段

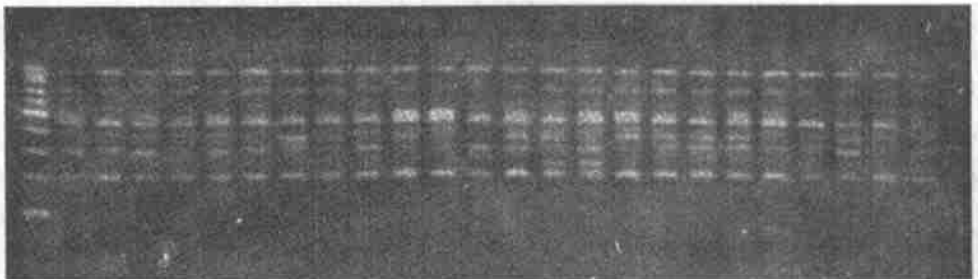
编号	引物名称	序列 (5'~3')	扩增总谱带 (多态谱带)	编号	引物名称	序列 (5'~3')	扩增总谱带 (多态谱带)
1	S012	CCTTGACGCA	5(1)	15	S063	GGGGGTCTTT	8(7)
2	S013	TTCCCCGCT	4(3)	16	S064	CCGCATCTAC	6(4)
3	S016	TTTGCCCGGA	6(5)	17	S066	GAACGGACTC	4(1)
4	S020	GGACCCFTAC	7(4)	18	S067	GTCCCAGCA	7(6)
5	S025	AGGGGTCTTG	4(1)	19	S070	TGTCTGGGTG	6(5)
6	S032	TCGGCGATAG	8(6)	20	S072	TGTCATCCCC	5(2)
7	S034	TCTGTCTCTGG	4(0)	21	S076	CACACTCCAG	4(1)
8	S035	TTCCGAACCC	6(1)	22	S094	GGATGAGACC	7(2)
9	S036	AGCCAGCGAA	5(0)	23	S101	GGTCGGAGAA	6(4)
10	S037	GACCGCTTGT	9(6)	24	S142	GGTCGGGAA	9(3)
11	S052	CACCGTATCC	6(1)	25	S299	TGAGGGTCCC	7(1)
12	S057	TTTCCCACGG	5(3)	26	S2083	TGGACTCGGT	7(2)
13	S059	CTGGGGACTT	6(6)	27	S2084	CCCAAGCGAA	7(3)
14	S061	TTCCAGCCAG	5(2)	28	S2093	TCGGTGAGTC	10(5)
				总计			173(85)

从表 1 中可以看出 28 个引物扩增出的谱带表现较丰富的多态性。各引物检测到的 RAPD 位点数介于 4~ 10 之间, 平均每个引物提供 6. 18 个 RAPD 标记的信息量。在 6 个群体中 28 个引物共扩增出 173 个位点, 其中 85 个多态位点, 占 49. 13%。这个结果表明在 6 个群体之间具有较丰富的 DNA 序列多态性。



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24  
产地无性系

1~ 4. 广东高州; 2~ 8. 广东封开; 9~ 12. 广西桂林;  
13~ 16. 广东增城; 17~ 20. 广东怀集; 21~ 24. 广西南宁  
图 1 随机引物 S32 扩增 6 个产地部分撑篙竹无性系的 DNA 电泳结果



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24  
产地无性系

1~ 4. 广东高州; 2~ 8. 广东封开; 9~ 12. 广西桂林;  
13~ 16. 广东增城; 17~ 20. 广东怀集; 21~ 24. 广西南宁  
图 2 随机引物 S37 扩增 6 个产地部分撑篙竹无性系的 DNA 电泳结果

## 2.2 群体的遗传多样性与分化

遗传多样度和香农(Shannon)信息指数是衡量生物遗传多样性的两个重要指标。基于 28 条 RAPD 引物所扩增出的多态条带, 利用 POPGENE1. 31 软件计算的有效等位基因数  $N_e$ 、基因多样性指数  $H_e$  和 Shannon 信息指数  $I$  等指标列于表 2 中。撑篙竹群体基因多样度和 Shannon 信息指数  $I$  分别为 0. 211 4 和 0. 327 7, 说明其遗传多样性是比较高的; 群体间基因分化系数  $G_{st}$  值为 0. 185 3, 说明撑篙竹群体间变异分量平均占总变异量的 19% 左右, 81% 左右的遗传变异存在于群体内。

表2 6个产地撑篙竹地理群体的遗传多样性与分化

指标	观测等位 基因数 $N_a$	有效等位 基因 $N_e$	基因多样 度 $H_e$	Shannon 信息指数 $I$	总群体基因 多样性 $H_t$	群体内基因 多样性 $H_s$	群体间基因分化 系数 $G_{st}$
平均数	1.720 9	1.343 2	0.211 4	0.327 7	0.211 4	0.172 2	0.185 3
标准差	0.449 9	0.337 3	0.179 6	0.254 1	0.032 2	0.023 5	

### 2.3 群体间的遗传相似度及聚类图

基因分化系数只能对群体分化的程度作出评价,却不能判定群体间相互关系的远近,而遗传相似系数和遗传距离的度量则可以说明每个群体间彼此关系的远近。故进一步计算出各群体间的遗传相似系数和遗传距离(表3),群体间遗传相似系数由0.940 5变化到0.994 2,说明群体间的亲缘关系较近。撑篙竹各群体的遗传距离在0.005 8~0.061 3范围内变动,平均为0.035 0,遗传距离较小。

表3 撑篙竹6个产地群体的  $N_{ef}$  s非偏差遗传距离和遗传相似系数

地点	广东高州	广东封开	广西桂林	广东增城	广东怀集	广西南宁
广东高州		0.971 0	0.947 8	0.940 5	0.942 1	0.941 7
广东封开	0.029 5		0.971 7	0.956 7	0.967 5	0.962 4
广西桂林	0.053 6	0.028 7		0.978 7	0.982 5	0.983 7
广东增城	0.061 3	0.044 3	0.021 6		0.994 2	0.969 5
广东怀集	0.059 6	0.033 0	0.017 6	0.005 8		0.976 2
广西南宁	0.060 0	0.038 4	0.016 4	0.031 0	0.024 1	

注:左下角为遗传距离,右上角为遗传相似系数。

为了衡量群体间和群体内遗传变异的程度,再一次利用AMOVA软件对6个撑篙竹群体进行遗传变异分析。从表4可以看出群体间的分化达到显著性差异,约82%的遗传变异是由于个体之间的差异造成的,而有18%的遗传变异是由于群体的不同造成的。这也进一步证实了对于撑篙竹这样分布范围较窄又常用无性繁殖的物种其群体间可供利用的遗传变异不大。

表4 6个产地撑篙竹地理群体30丛材料基于RAPD的AMOVA分析

变异来源	自由度	平方和	均方	$PHI_{st}$	均方比	显著性检测
群体间	5	100.900	20.180	0.068	2.084(17.6%)	< 0.05
群体内	24	234.192	9.758		9.758(82.4%)	
总计	29	335.092				

注:  $PHI_{st}$  表示估算系统演化亚分类水平上基因型多样性相关程度的指数。

根据遗传距离利用UPGMA聚类法得出了6个撑篙竹群体的亲缘关系树状图(图3)。利用RAPD标记将6个产地的撑篙竹群体划分为3类。广东增城与怀集群体最先聚在一起为第1类,因为增城地处广州东部,为粤东粤西的交通要道,且增城与怀集都具有丰富的森林资源,加之交通便利,有利于林木资源的调运;广西桂林和南宁群体聚在一起,划为第2类;广东封开与高州群体聚在一起,划为第3类;第1、2两个分支聚在一起后再与第3分支聚在一起,广西的群体与广东增城和怀集群体之间有较近的亲缘关系,因为怀集毗邻广西,故其群体间可能相互引种;而广东封开、高州位于粤西南部靠近南海,而且其地形较为复杂,森林资源也有别于其它县市,撑篙竹群体与其它群体亲缘关系也相对较远。

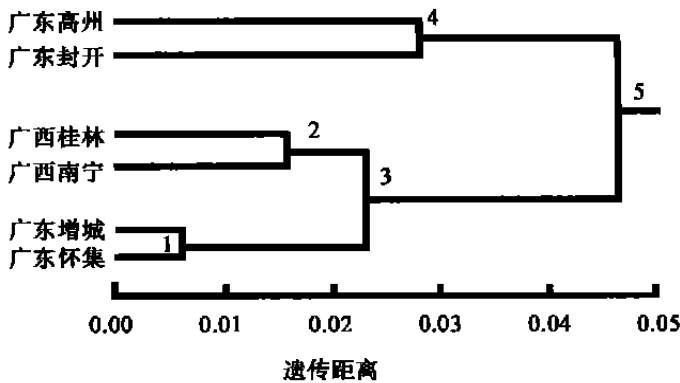


图 3 撑篙竹 6 个产地群体 UPGMA 聚类法得出的树状图

### 3 结论与讨论

(1) 关于 RAPD 技术在竹类植物品种鉴定和纯度分析上应用的可靠性, 虽有不少报道认为, 由于其重复性较差和非特异性扩增, 使得其稳定性较差, 但同时许多研究也表明, 只要反应条件严格控制, 重复结果是可以得到的。本研究结果进一步表明, RAPD 技术在竹类植物种质鉴定上应用的可靠性关键在于引物的筛选及标准模式的建立, 但对于不同的材料, 尚需进行深入探索, 才能筛选到合适的引物并建立起多态性扩增的标准模式与图谱, 使鉴定手段快速简便, 结果准确可靠。

(2) 植物群体的遗传结构对其进化进程、引种驯化和基因保存的重要性已受到普遍的重视。Gst 是遗传分化的衡量指标, Ellstrand & Elam<sup>[13]</sup> 认为  $Gst > 0.1$  意味着群体间变异程度较高。本研究利用 28 个不同随机引物对撑篙竹 6 个产地群体的 DNA 序列进行了分析, 其群体间基因分化系数 Gst 值为 0.185 3, 大于 0.1, 说明撑篙竹是群体间分化较大的一类丛生竹种。方差分析的结果也表明撑篙竹群体分化较明显, 但群体间变异量仅占总变异量的 18% 左右, 82% 左右的遗传变异存在于群体内个体间。建议对广东、广西撑篙竹遗传资源进行全面考察, 以确定广东、广西地区在中国撑篙竹起源与进化中的地位并确定中国撑篙竹遗传资源的开发目标和策略。鉴于本文所取群体和无性系数较少, 应该增加试验及样本数, 才能使得结果更加可靠。

(3) 由于竹类植物特殊的生物学特性, 过去所采用的分类方法很难对其进行准确的分析和鉴定, 因而限制了竹类植物种质资源的获得、保护和充分利用, 降低了竹类植物育种效率。目前, 各种 DNA 分子标记均可用于指纹图谱分析, 但 RAPD 标记在竹类植物上发表最多、应用最广。撑篙竹的分布范围相对较狭小, 而且从形态上比较难以区分, 本研究利用 RAPD 技术对 6 个产地的撑篙竹种质资源进行了聚类分析, 虽然所取群体样本数相对较少, 但不同产地的撑篙竹群体也可以明显地被区分开来。可见, 结合分类学上竹类植物的分类现状, RAPD 技术作为一种遗传标记, 用于鉴定竹类品种及竹子无性系等是很有价值的, 并能对分类上有争议的问题提供一种很好的解决办法。

## 参考文献:

- [1] Friar E, Kohert G. A study of genetic variation and evolution of *Phyllostachys* (Bambusoideae: Poaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994(89): 265~ 270
- [2] Kobayashi M. Phylogeny of world bamboos analyzed by restriction fragment length polymorphisms of chloroplast DNA[M]. In: Chapman G P. The bamboos. Linnean Society Symposium Series. U K: Linnean Society of London, 1997. 227~ 234
- [3] Loh Jin Phang, Ruth Kiew, Ohn Set, et al. A study of genetic variation and relationships within the bamboo subtribe Bambusinae using amplified fragment length polymorphism[J]. Annals of Botany, 2000(85): 607~ 612
- [4] Hsiao J Y, Lee S M. Genetic diversity and microgeographic differentiation of Yushan cane (*Yushania nitakayamensis*; Poaceae) in Taiwan[J]. Molecular Ecology, 1999, 8(2): 263~ 270
- [5] Lai C C, Hsiao J Y. Genetic variation of *Phyllostachys pubescens* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan based on DNA polymorphisms [J]. Botanical Bulletin Academia Sinica, 1997(38): 145~ 152
- [6] 庞延军, 杨永华, 胡成华, 等. 从 RAPD 看肿节少穗竹的分类地位初探[J]. 南京大学学报(自然科学版), 1998, 34(5): 531~ 535
- [7] 杨光耀, 赵奇僧. 用 RAPD 分子标记探讨倭竹族的属间关系[J]. 竹子研究汇刊, 2001, 20(2): 1~ 5
- [8] 方伟, 何祯祥, 黄坚钦, 等. 雷竹不同栽培类型 RAPD 分子标记的研究[J]. 浙江林学院学报, 2001, 18(1): 1~ 6
- [9] 师丽华, 杨光耀, 林新春, 等. 毛竹种下等级的 RAPD 研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2002, 26(3): 65~ 68
- [10] 李淑娴, 尹佟明, 邹惠渝, 等. 用水稻微卫星引物进行竹子分子系统学研究初探[J]. 林业科学, 2002, 38(3): 42~ 48
- [11] Tai T H, Tanksley S D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue[J]. Plant Molecular Biology Reports, 1990(8): 297~ 303
- [12] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89: 583~ 590
- [13] Ellstrand N C, Elam D R. Population genetic consequence of small population size: implications for plant conservation[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1993(24): 217~ 242

## RAPD Analysis on Genetic Variation of *Bambusa pervariabilis* McClure

XING Xin-ting, FU Maoyi, FEI Xue-qian, JIANG Jing-min

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

**Abstract:** Thirty clumps of six populations of *Bambusa pervariabilis* were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to determine the genetic variations among and within the populations. A total of 173 loci including 85 polymorphic loci were amplified using 28 random primers, with an average of 6.18 fragments each primer. The length of fragments was between 200 bp and 2 000 bp. As analyzed by POPGENE version 1.31, the data from six populations had an average Nei's gene diversity of 0.211 4, and Shannon's genetic diversity of 0.327 7, coefficient of gene differentiation (*Gst*) of 0.185 3, indicating that there was some differentiation among the populations. The average genetic distance among populations was 0.035 0, indicating that there was close relative relations among populations. The six populations were clustered to three categories by cluster analysis (UPGMA) based on Nei's unbiased genetic distance.

**Key words:** *Bambusa pervariabilis*; RAPD; population; genetic variation