

五种杨树叶绿体DNA的提取及RFLP分析*

卢孟柱 卞祖娟

(中国林业科学研究院林业研究所)

关键词 杨树 叶绿体 DNA 限制性片段长度多型性

近几年,叶绿体DNA的研究越来越受到重视,因为叶绿体不仅是植物光合作用的器官,而且DNA分子结构紧凑,相对于核DNA而言,分子量小,结构简单,更易从分子水平上作精细分析。另外,叶绿体DNA具有稳定性、进化缓慢性及编码序列的保守性,因而是研究植物系统发育的好材料^[1]。虽然在许多植物中,叶绿体DNA分子非常保守,环状结构大都含有由两个单拷贝区分割的反向重复序列^[1],但在一些豆科作物和针叶树中却发现没有反向重复序列,从而使叶绿体DNA在这些植物中出现了较大变异,并表现为父系遗传^[1,2]。此外,在玉米、烟草、油茶等植物上也发现了DNA序列在种属水平上的变异,有人依据这些变异进行了分类及系统进化研究^[3,4]。证明以叶绿体DNA为材料,经限制性内切酶降解,用所产生的限制性片段长度多型性(RFLP)来研究分类及系统进化,具有重复性高和不受环境条件影响等优点。

本试验以分类复杂、分布极广、有较高经济价值的杨树为材料,对五种杨树进行了叶绿体DNA的提取、纯化及限制性酶切分析。试验为杨树的分类、杂交育种、系统发育及叶绿体DNA分子生物学研究提供方法和依据。

1 材料和方法

1.1 杨树材料

美洲黑杨姊妹系[*Populus deltoides* Bartr. CL. 'Lux'(69杨)×*P. deltoides* Bartr. CL. 'Harvard'(63杨)]34-119和34-286;美洲黑杨(来自美国Oklahoma州)的两个天然杂交种88-8-1和88-8-2;苦杨(*P. laurifolia*,来自原苏联)。

1.2 试剂及仪器

RNA酶A、蛋白酶K、EcoRI等5种内切酶均购自华美生物工程公司;Sepharose 2B凝胶和紫外检测设备为Pharmacia公司的产品。

1.3 试验方法

叶绿体DNA的提取、纯化采用龚小松等^[5]提取方法,但做如下改动:取五种杨树幼嫩叶片各50g,冲洗后饥饿24h,加入0.2L溶液A^[5],低速匀浆二次,每次5s,高速匀浆二次,

1992-02-21收稿。

*本试验得到王学聘、韩一凡先生指导,张香华、韩一依同志参加部分工作,谨此表示感谢。

每次10 s，过滤后分装在两个0.05 L离心管中，用溶液B、C^[6]各洗二次，以后所用溶液体积与原方法相同。最后叶绿体DNA粗提液过Sepharose 2B柱(15 cm×1 cm)，收集第一峰(254 nm 紫外检测)，乙醇沉淀后放-20℃过夜，离心后将沉淀溶于0.25 L TE缓冲液中。

叶绿体DNA的酶切，依照生产商提供的反应条件进行。在0.03 L反应体积中，加入叶绿体DNA约3 μg，内切酶0.003 L，10倍酶切缓冲液0.003 L，水补足反应体积，37℃酶切至少2 h。酶切产物的电泳采用0.7%的琼脂糖凝胶按Sambrook等^[8]方法进行。

2 结果与分析

2.1 叶绿体DNA的提取及纯化

叶绿体经反复差速离心和洗涤后，显微镜观察未见细胞碎片污染，表明纯度较高。叶绿体经Sarcosyl、蛋白酶K处理后通过Sepharose 2B柱可使叶绿体DNA与RNA分开，从而得到进一步的纯化(见图1)。叶绿体DNA的酶切结果(图2~4)表明，此方法用于杨树叶绿体DNA的提取及纯化可满足酶切分析的要求。

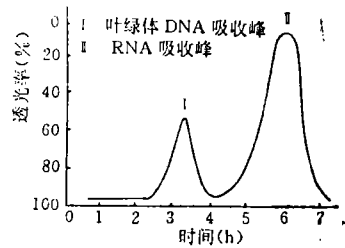


图1 叶绿体DNA粗制品在Sepharose 2B柱上的层析曲线

2.2 叶绿体DNA的酶切分析

用Sal I、Pvu II和Pst I三种内切酶所产生的五个样品的叶绿体DNA酶切图谱完全一致(见图2)，没有发现差异，表明杨树叶绿体DNA结构、序列相当保守，进化缓慢。

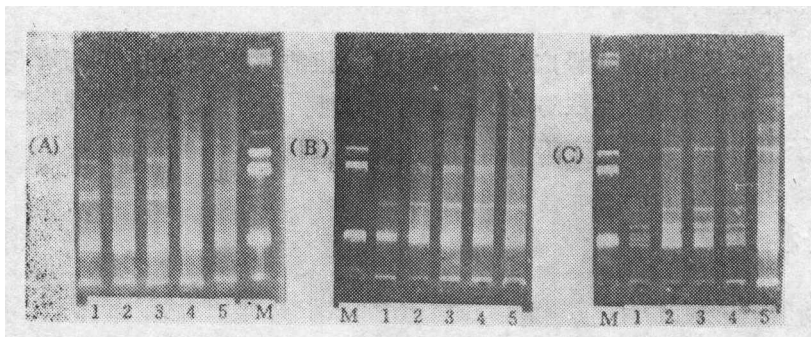


图2 叶绿体DNA的Sal I(A)、Pst I(B)和Pvu II(C)的酶切图谱

1. 34-119; 2. 苦杨; 3. 34-286; 4. 88-8-1; 5. 88-8-2; M. 分子量对照、λDNA/EcoRI/Hind III

美洲黑杨连同其天然杂交种共四个样品用EcoRI所作的酶切图谱没有区别，但苦杨缺少存在于其他样品中的5.0 kb和4.0 kb两条带，但多一条3.8 kb的带。因此，EcoRI产生的RFLP至少可区分开苦杨与美洲黑杨(见图3)。

在用BamH I所作的酶切图谱中(见图4)，苦杨少一条分子量为5.6 kb带，而多一条约5.0 kb带，也可区分开苦杨和美洲黑杨及其天然杂交种。在天然杂交种88-8-1的谱带中，存在一条15.8 kb的带而在88-8-2中不存在，表明两者存在着差异，依据此差异可区分这两个天然杂交种。

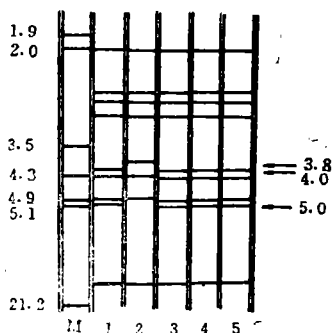


图3 叶绿体DNA的EcoR I酶切图谱示意

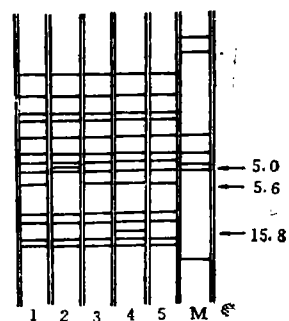


图4 叶绿体DNA的BamH I酶切图谱示意

(图例说明见图1; 箭头所示为出现差异的带, 图中数字为分子量大小, 单位为kb)

3 讨论

(1) 叶绿体DNA提取、纯化的关键在于提纯叶绿体时防止核DNA的污染。本试验在原方法基础上, 将匀浆次数由原方法3~4次, 减少为2次, 避免了因叶绿体膜损伤造成的核DNA的污染。同时增加了用溶液B和C洗涤叶绿体的次数, 尽可能除去吸附在叶绿体上的核DNA及其他杂质, 从而提高叶绿体DNA的纯度。但如果构建叶绿体DNA的基因文库, 尚需采用CsCl密度梯度离心做进一步的纯化。

(2) DNA结构的改变(DNA片段的插入、缺失、易位及点突变等)是探测叶绿体DNA的RFLP的前提。由Sal I、Pst I和Pvu II所产生的酶切图谱完全一致, 表明杨树叶绿体DNA在进化过程中非常保守, 结构没有发生很大改变(无缺失或插入DNA片段), 所以未检测到差异。而用EcoR I和BamH I酶切所产生的差异是由于酶切位点上发生了变化(点突变), 失去或产生了新的酶切位点造成的。因此, 用更多的内切酶来寻找叶绿体DNA的差异很有必要。

(3) 美洲黑杨的天然杂交种88-8-1和88-8-2, 由BamH I酶切图谱上的差异, 可以区分开来。但差异是来自个体发育中的突变, 还是父本不同所引起的? 尚需进一步试验证实。总之, 叶绿体DNA的RFLP分析可区分天然杂交种, 表明这一方法可应用于杨树的种质鉴定和种质渗透的研究。

(4) 本试验采用的凝胶浓度为0.7%, 在此浓度下, 小于2 kb的DNA片段很难分离成带。所以检测小于2 kb的片段的差异, 需要增加胶浓度或用分子杂交等方法。

(5) 本研究用叶绿体DNA的酶切图谱比较了苦杨与美洲黑杨及其天然杂交种之间的差异。从得到的初步结果可以预测, 选取更多的内切酶, 建立酶切图谱, 进行杨树各派、种的叶绿体DNA的RFLP分析, 对杨树分类、杂交育种及阐明系统进化具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Palmer J D. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am. Nat.*, 1987, 130, 56~59.
- 2 Lidholm J, Szmidt A E, Hallgren J E, et al. The chloroplast genome of conifer lack one of the rRNA-encoding inverted repeats. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, 212, 6~10.
- 3 Szmidt A E, El-Kassaby Y A, Sigurgeirsson A, et al. Classifying seedlots of *Picea sitchensis* and *P. glauca* in zone of introgression using restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 1988, 76, 841~845.
- 4 Palmer J D, Jorgensen R A, Thompson W F. Chloroplast DNA variation and evolution in *Pisum*: patterns of change and phylogenetic analysis. *Genetics*, 1985, 109, 195~213.
- 5 袁小松, 阎鹏飞. 高等植物叶绿体 DNA 提纯方法的改进. *科学通报*, 1991, 6: 467~469.
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, A laboratory manual*: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 6.3~6.16.

*Studies on the Isolation and RFLP Analysis
of Poplar Chloroplast DNA*

Lu Mengzhu Bian Zuxian

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract Chloroplast DNA (cpDNA) were prepared from five Poplar samples (two hybrids of *Populus deltoides* Bartr. CL. 'Lux' × *P. deltoides* Bartr. CL. 'Harvard', two natural hybrids of *P. deltoides* and one sample of *P. laurifolia*) and analysed with five restriction enzymes. The results show that although the cpDNA diversity between Sect. *Tacamahaca* Spach. and Sect. *Aigeiros* Duby is low, they can be distinguished by using the restriction fragment length polymorphisms (RFLP) generated by EcoR I and BamH I. The RFLP generated by BamH I can also be used to distinguish the two natural hybrids of *P. deltoides*. So the analysis of Poplar cpDNA RFLP provides a molecular biological method for Poplar classification, cross breeding program and phylogenetic studies.

Key words Poplar chloroplast DNA restriction fragment length polymorphisms (RFLP)