

# 中国特有植物卧龙沙棘自然群体的 RAPD 分析

陈 纹, 孙 坤\*, 张 辉, 苏 雪, 陈学林, 马瑞君

(西北师范大学 植物研究所, 兰州 730070)

**摘要:** 应用 12 个随机引物对卧龙沙棘全部 2 居群共 28 个个体进行了 RAPD 分析。结果表明, 卧龙沙棘具有较丰富的遗传多样性, 多态位点百分率为 78.05%, Nei's 基因多样性  $h=0.2553$ , Shannon's 多态性信息指数  $I=0.3841$ 。分布范围狭窄的卧龙沙棘在亚种水平的遗传多样性明显高于分布较广的中国沙棘。在居群水平上, 卧龙沙棘同样具有很高的遗传多样性, 平均多态位点百分率为 63.42%, Nei's 基因多样性  $h=0.2193$ , Shannon's 多态性信息指数  $I=0.3287$ 。卧龙沙棘的基因分化系数  $G_{st}=0.1425$ , 表明遗传变异主要存在于居群内。AMOVA 的结果也表明, 在全部的遗传变异中, 19.18% 的遗传变异存在于居群之间, 与  $G_{st}$  值基本一致。这一结果符合卧龙沙棘风媒、异交的繁育系统特点。

**关键词:** 卧龙沙棘; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)02-0152-04

## RAPD analysis of natural populations on Chinese endemic *Hippophae rhamnoides* ssp. *wolongensis* (Elaeagnaceae)

CHEN Wen, SUN Kun\*, ZHANG Hui, SU Xue,  
CHEN Xue-Lin, MA Rui-Jun

(Institute of Botany, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** 12 primers were used to examine gene diversity of *H. rhamnoides* L. ssp. *wolongensis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD). 78.05% in total of the scorable markers were polymorphic at subspecies level. Nei's gene diversity ( $h$ ) and Shannon index ( $I$ ) were 0.2553 and 0.3841, respectively. As an endemic species whose distribution is very limited, ssp. *wolongensis* has high genetic diversity compared to ssp. *sinensis*. At population level, high genetic variation was also detected; total means of three parameters ( $PPB$ ,  $h$  and  $I$ ) were 63.42%, 0.2193 and 0.3287, respectively. The  $G_{st}$  showed 14.25% genetic variation among populations, which indicated most of the variation existed mainly within populations. The results of AMOVA showed 19.18% differentiation among populations. These results were in consistent with the characters that *H. rhamnoides* L. ssp. *wolongensis* is an outcrossing, wind-pollinated plant.

**Key words:** *H. rhamnoides* L. ssp. *wolongensis*; RAPD; gene diversity

收稿日期: 2005-06-13 修回日期: 2006-01-29

基金项目: 国家自然科学基金(30570110); 西北师范大学科技创新工程(No. 02); 西北师范大学青年教师科研基金(NWNU-QN-04-30); 西北师范大学重点学科建设项目 [Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570110); Science and Technology Innovation Project of Northwest Normal University(No. 02); Scientific Research Foundation for the Youth Scholars of Northwest Normal University(NWNU-QN-04-30); Key Subjects Construction Program of Northwest Normal University]

作者简介: 陈纹(1978-), 女, 甘肃天水人, 硕士, 从事植物分子遗传学研究。

\* 通讯作者 (Author for correspondence)

遗传多样性和居群遗传结构是居群生物学的重要内容。对遗传多样性的研究可以揭示物种或居群的进化历史和机制,也能为进一步分析其进化潜力和将来命运提供重要资料(Soltis 等,1991)。居群遗传结构上的差异是遗传多样性的重要体现,一个物种的进化潜力和抵御不良环境的能力也有赖于居群的遗传结构(Grant,1991;Millar 等,1991)。

沙棘属(*Hippophae*)是重要的水土保持和经济植物,广布于我国干旱、半干旱地区,包括 7 种 10 亚种。其中,沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)共 9 亚种,分布于中国、蒙古、中亚至欧洲地区,是沙棘属植物中分布范围最广的一个种。近年来的调查表明,沙棘的不同亚种间,同一亚种不同居群间以及同一居群内都存在有丰富的形态变异(Yao 等,1992;廉永善,2000)。自 Yao 等(1993)利用同工酶对几种沙棘属植物进行遗传多样性研究之后,近年来,Bartish 等(2000,2002)及本文作者应用 RAPD 方法分别对欧洲分布的海滨沙棘(*H. rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*)和我国特有的中国沙棘(*H. rhamnoides* L. ssp. *sinensis*)二个亚种的遗传多样性进行了研究。最近,作者等对中国沙棘属植物进行野外居群调查的过程中,在川西高原和四川盆地过渡地带发现一新亚种,即卧龙沙棘(*H. rhamnoides* L.

ssp. *wolongensis* Lian, K. Sun et X. L. Chen)(Lian 等,2003)。本文是应用 RAPD 方法对卧龙沙棘的遗传多样性研究的报道,其结果将为今后进一步探讨卧龙沙棘的遗传变异与进化机制提供理论基础。

表 1 用于扩增的 12 个随机引物及序列

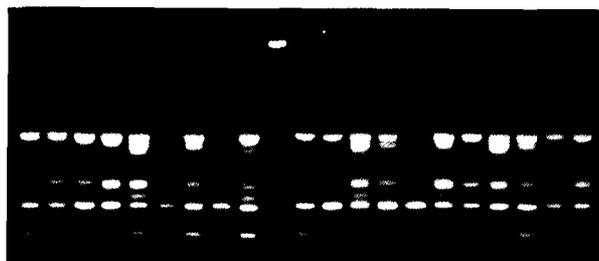
Table 1 12 random oligonucleotide primer and sequences

引物号 Primer No.	序列 Sequences	引物号 Primer No.	序列 Sequences
S5	TGCGCCCTTC	S298	GTGGAGTCAG
S45	TGAGCGGACA	S352	GTCCCGTGGT
S94	GGATGAGACC	S357	ACGCCAGTTC
S97	ACGACCGACA	S368	GAACACTGGG
S273	CACAGCGACA	S414	AGGGTTCGTTC
S276	CAGCCTACCA	S429	TGCCGGCTTG

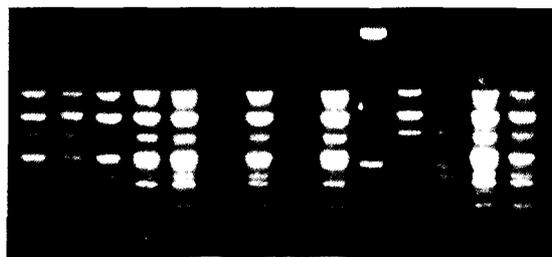
## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

卧龙沙棘目前仅发现有四川省汶川县和茂县两地的两个居群,其中四川省汶川县卧龙的居群(W1)分布在海拔 1 660~2 200 m 处,茂县较场长海的居群(W2)分布在海拔 2 320~2 370 m 的狭小范围内,且两居群个体数目有限。在野外取样时以大部分个体为材料,分单株取新鲜幼叶,硅胶干燥备用。



Primer S97



Primer S414

图 1 卧龙沙棘个体的 RAPD 图谱

Fig. 1 RAPD results of *H. rhamnoides* ssp. *wolongensis*

### 1.2 总 DNA 提取

采用 CTAB 微量法提取总 DNA,具体操作同 Xie 等(2001)的方法,根据本实验材料稍作改动。

### 1.3 扩增反应及产物检测

从上海生工公司 S 系列的 136 个随机引物中筛选出 12 个扩增产物清晰、稳定、重复性高、多态性丰富的引物,对两居群共 28 个个体基因组 DNA 进行 RAPD 实验。引物及其序列见表 1。PCR 扩增程序和反应体系同 Qian 等(2001),DNA 扩增反应在

Rapidcycler 1818 (idaho Tech.)上完成。

扩增产物用 1.5% 琼脂糖(Promega)凝胶电泳分离,EB 染色,用 Bio-Rad 图像分析仪(Gel Doc 2000 Gel Documentation System)观察并记录。以分子量范围 100~3 000 bp 的 DNA 标准分子量为对照,确定扩增片段的分子量大小。扩增产物见图 1。

### 1.4 数据统计与分析

根据反应产物在电泳图谱中的位置,以扩增条带的有无记为“1”或“0”,形成 RAPD 表型的 0/1 数

据矩阵。用 POPGENE32 (Yeh 等, 1997) 软件计算各居群的多态位点百分率 (PPB)、Nei's 基因多样性 ( $h$ )、Shannon's 多态性信息指数 ( $I$ )、亚种基因多样性 ( $H_t$ )、居群基因多样性 ( $H_s$ )、基因分化系数 ( $G_{st}$ ) 和 Nei's 遗传距离。应用分子方差分析软件 AMOVA 分析遗传变异在居群间和居群内的分配。用 NTSYS 软件根据平均分类距离对单株进行 UP-GMA 聚类分析。

## 2 结果

用 12 个随机引物对卧龙沙棘两居群 28 个个体

进行 RAPD 分析, 共检测到 82 个位点, 平均每个引物 6.8 个位点, 其中 64 个为多态位点, 多态位点百分率 (PPB) 为 78.05%。Nei's 基因多样性  $h=0.2553$ , Shannon's 多态性信息指数  $I=0.3841$ 。在居群水平上, 居群 W1 和居群 W2 的多态位点百分率分别为 58.54% 和 68.29%, 平均  $PPB=63.42\%$ , 两居群的 Nei's 基因多样性分别为 0.2228, 0.2157, Shannon's 多态性信息指数为 0.3282 和 0.3292。PPB 值和 Shannon's 多态性信息指数 ( $I$ ) 表明居群 W2 的遗传多样性高于 W1, 但 Nei's 基因多样性 ( $h$ ) 的结果略有不同。各遗传多样性参数见表 2。

POPGENE 的计算结果 (表 3) 显示, 卧龙沙棘

表 2 卧龙沙棘的遗传多样性参数

Table 2 Genetic parameters of *H. rhamnoides* L. ssp. *wolongensis*

居群 Population	个体数 No. of samples	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (PPB)	Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity ( $h$ )	Shannon's 指数 Shannon index ( $I$ )
W1	13	48	58.54	0.2228	0.3282
W2	15	56	68.29	0.2157	0.3292
平均 Mean		52	63.42	0.2193	0.3287
亚种 Subspecies		64	78.05	0.2553	0.3841

的居群遗传多样性  $H_s=0.2193$ , 基因分化系数  $G_{st}=0.1425$ , 表明遗传变异主要存在于居群内。AMOVA 的结果与 POPGENE 的结果基本一致, 在全部遗传变异中, 80.82% 的遗传变异存在于居群内个体间, 居群间的遗传分化为 19.18%, 稍高于  $G_{st}$  值。对基因流的计算结果表明, 卧龙沙棘居群间每代迁移数目  $N_m$  为 3.0076, 表明在居群间存在较频繁的基因流。

表 3 卧龙沙棘居群的遗传分化

Table 3 Genetic variation of *H. rhamnoides* L. ssp. *wolongensis*

亚种遗传多样性 Subspecies ( $H_t$ )	居群遗传多样性 Population gene diversity ( $H_s$ )	基因分化系数 Population differentiation ( $G_{st}$ )	每代迁移数目 Transference No. of each generation ( $N_m$ )
0.2557	0.2193	0.1425	3.0076

Note:  $N_m=0.5(1-G_{st})/G_{st}$ .

根据 0,1 矩阵对卧龙沙棘两居群 28 个个体的聚类分析结果 (图 2) 表明, 除 W2 的 1 个个体较特殊, 单独聚为 1 支外, 其余 27 个个体明显分为 2 支, 其中一支以 W1 的个体为主, 包括 7 个 W1 的个体与 W2 的 3 个个体; 另一支中, 除 W2-1 与 W1 的 6 个个体聚在一起, W2 的其余个体聚为一支。从聚

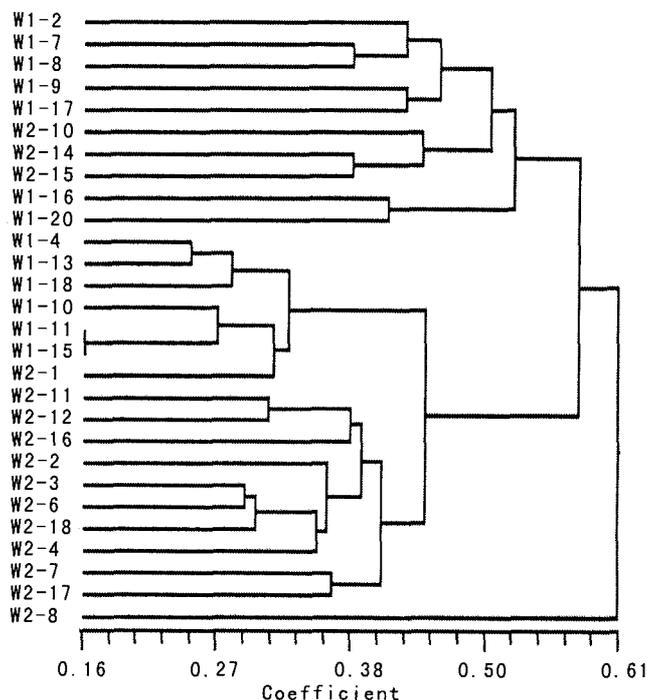


图 2 卧龙沙棘 2 居群 28 个个体的聚类图

Fig. 2 Clustering of individuals from 2 populations of *H. rhamnoides* L. ssp. *wolongensis*

类结果看出, 部分 W1 和 W2 的个体相互聚在一起, 说明两居群间存在一定的遗传分化, 但还不够显著。

### 3 讨论

物种的分布范围是影响遗传多样性水平的主要因素之一,自然分布范围广的物种通常比分布范围小的物种具有更高的遗传变异水平(Man-Kyu 等, 2000; Hamrick 等, 1989)。遗传多样性是植物长期进化的结果,同时代表了植物的进化潜力,因而为了物种生存,植物在较为恶劣的生境条件下进化并积累了较多的遗传变异。卧龙沙棘生长在川西高原和四川盆地的过渡地带,仅在四川省汶川和茂县两地发现,分布区狭小。其中,四川省汶川县卧龙的居群(W1)呈星散状分布于海拔 1 660~2 200 m 的山坡基部和河滩林缘;另一居群(W2)发现于茂县,分布于海拔 2 320~2 370 m 的山坡上,形成稀疏的沙棘灌丛。RAPD 分析的结果表明,卧龙沙棘的多态位点百分率  $PPB=78.05\%$ ,说明卧龙沙棘具有很高的遗传变异。Nei's 基因多样性( $h=0.2553$ )和 Shannon's 多态性信息指数( $I=0.3841$ )也反映了卧龙沙棘具有较丰富的遗传多样性。作者对分布区跨越很大的地理、空间距离的中国沙棘的遗传多样性进行的研究发现中国沙棘的多态位点百分率  $PPB=89.72\%$ ,  $h=0.204$ ,  $I=0.325$ (Sun 等,待发表)。虽然中国沙棘的  $PPB$  值明显高于卧龙沙棘的  $PPB$  值,但  $h$  和  $I$  都表明卧龙沙棘的遗传多样性高于中国沙棘。可见,卧龙沙棘虽然属于分布范围小的特有种,却具有丰富的遗传多样性。同时,卧龙沙棘在居群水平上也具有很高的遗传多样性。虽然只有两个居群,但卧龙沙棘在居群水平上的遗传多样性参数均高于 Bartish 等所研究的海滨沙棘( $PPB=55.9\%$ ,  $h=0.192$ )(Bartish 等, 1999)和作者等研究的中国沙棘( $PPB=55.81\%$ ,  $h=0.1679$ ,  $I=0.2593$ )两个分布较广的亚种。卧龙沙棘分布于中国沙棘分布区的边缘,该亚种很可能是由中国沙棘边缘居群分化形成的亚种(Lian 等, 2003)。因此,高水平的居群遗传多样性是卧龙沙棘在较为恶劣的生境条件下进化并积累了较多的遗传变异的结果。

卧龙沙棘基因分化系数  $Gst=0.1425$ ,即两居群间的遗传变异占总遗传变异的 14.25%,略低于异交植物 19.3% 的平均值(Bussell, 1999),表明遗传变异主要存在于居群内,居群间的遗传分化较小。AMOVA 的分析结果表明,全部遗传变异中,居群间的遗传变异为 19.18%,与  $Gst$  显示的结果基本

一致。聚类分析的结果同样也反映了两居群间较小的遗传分化。Hamrick 等(1990)通过对基于同工酶分析的 165 属共 449 种植物的遗传多样性和遗传结构的总结发现,生活型、分布范围等 8 个因素明显影响居群的遗传变异水平,而繁育系统是影响居群遗传结构的最重要因素。由于基因流是使居群遗传结构均质化的主要原因之一,具有有限基因流的物种往往较那些具有广泛基因流的物种有较大的遗传分化,有限的基因流是导致居群分化的一个主要原因。卧龙沙棘基因流的分析结果表明,两居群间的基因流为  $Nm=3.0076$ ,仅稍低于异交、风媒植物的基因流平均水平( $Nm=5.380$ )(Hamrick, 1987)。因此,频繁的交流是造成卧龙沙棘居群间遗传分化较小的原因。这一结果符合卧龙沙棘雌雄异株、风媒传粉、兼性营养繁殖的繁育系统特点。

### 参考文献:

- 廉永善. 2000. 沙棘属植物生物学和化学[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社:1-226
- Bartish IV, Jeppsson N, Nybom H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by RAPD markers[J]. *Molec Ecol*, **8**:791-802
- Bartish JV, Jeppsson N, Bartish GI, et al. 2000. Inter- and intraspecific genetic variation in *Hippophae* (Elaeagnaceae) investigated by RAPD markers[J]. *Plant Syst Evol*, **255**:85-101
- Bartish JV, Jeppsson N, Nybom H, et al. 2002. Phylogeny of *Hippophae* (Elaeagnaceae) inferred from parsimony analysis of chloroplast DNA and morphology[J]. *Syst Bot*, **27**(1):41-54
- Bussell JD. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae)[J]. *Mol Ecol*, **8**:775-789
- Grant V. 1991. The Evolutionary Process; A Critical Study of Evolutionary Theory [M]. New York: Columbia University Press
- Hamrick JL, Godt MJW. 1989. Allozyme diversity in plant species [M]//Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds). *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sunderland, Sinauer Press:304-319
- Hamrick JL. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations[M]//Urbanska K(ed). *Differentiation Patterns in Higher Plants*. New York: Academic Press:53-67
- Hamrick JL, Godt MJW. 1990. Allozyme diversity in plant species [M]//Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds). *Plant population genetics, breeding and genetic resources* Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA:43-63
- Lian YS, Chen XL, Sun K, et al. 2003. A new subspecies of *Hippophae* (Elaeagnaceae) from China[J]. *Novon*, **13**(2):200-202
- Man-Kyu HUH & Hong-Wook HUH. 2000. Patterns of genetic diversity and population structure of the clonal herb, *Potentilla* (下转第 145 页 *Continue on page 145*)

pagina basali parva inconspicua.

多年生小草本。根状茎斜生, 细, 长约 5 cm, 下部密生丝形长 1~2 cm 的细根, 在节上有残留的叶柄基部。茎 1 或 2 条, 渐升或直立, 高 9~14 cm, 与叶柄被贴伏柔毛, 在基部之上分枝, 有 1~2 茎生叶。基生叶约 12 枚, 具长柄; 叶片膜质, 圆卵形, 近圆形或宽卵形, 长 0.5~1.8 cm, 宽 0.8~1.5 cm, 顶端圆形或钝, 基部圆形或近截形, 两面密被贴伏短柔毛, 侧脉每侧 2~3 条, 不明显; 叶柄长 3~5 cm。茎生叶似基生叶, 但具短柄。螺状聚伞花序顶生, 具梗, 长 5~12 cm, 有多数花, 下部 2~4 枚苞片; 苞片似茎生叶; 轴和花梗细, 被贴伏柔毛。花淡蓝色; 花梗长 1~3 mm; 花萼宽钟状, 长约 1.6 mm, 5 深裂近基部或 5 全裂, 裂片狭长圆形或狭倒卵状长圆形, 宽 0.5 mm, 内面无毛, 外面被贴伏短柔毛; 花冠近辐状, 无毛, 筒长 0.8~1.1 mm, 冠檐直径 2.5~5 mm, 5 裂, 裂片倒卵状圆形, 宽 0.8~1.8 mm, 附属物 5, 近新月形, 长 0.4 mm; 雄蕊 5, 着生于花冠筒中部, 花药椭圆球形, 长 0.3 mm。小坚果 4, 四面体形, 黑褐色, 光滑, 稍有光泽, 无柄; 背面三角状卵形, 长 0.8~1.1 mm, 宽 0.6~0.8 mm, 稍鼓起, 2 腹面等大, 斜三角形, 稜有极狭边缘, 基生面小, 不明显。

重庆 (Chongqing), 南川 (Nanchuan): 金佛山 (Jinfo Shan), 古佛洞 (Gufodong), alt 1890 m, 洞口干燥地 (in dry places near cave mouth), 果黄褐色 (fruits fulvous), 1995-09-19, 刘正宇 (Liu Zheng-

yu) 15111 (主模式 holotype, PE); 同地 (same locality), 仙女洞 (Xiannudong), alt. 1970 m, 阴湿处 (in shady moist places), 花淡蓝色 (fl. bluish), 1994-09-07, 刘正宇 14412 (副模式 paratype, PE); 同地 (same locality), 仙女洞, alt. 1950 m, 阴湿石缝中 (in shady fissures of moist rocks), 1993-09-23, 刘正宇 14351 (副模式 paratype, PE)。

本种的叶呈圆卵形, 螺状聚伞花序下部具少数苞片, 以及小坚果呈四面体形, 而与圆叶附地菜 (*Trigonotis rotundata* Johnst.) (产云南西北, 四川西南部) 相似, 但后者的叶顶端具短尖头, 基部圆形或心形, 花梗较长, 长 5~10 mm, 花冠较大, 檐部直径 7 mm (王庆瑞, 1989) 而与本种不同。

上引采自古佛洞的主模式与采自仙女洞的副模式的小坚果很相似, 但在叶和花冠的大小方面存在差异: 在主模式, 叶片长达 2 cm, 宽达 1.5 cm, 花冠直径 5 mm; 在副模式, 叶片长达 1.5 cm, 宽达 1.1 cm, 花冠直径 2.5 mm。上述有关区别在上述二地居群中是否存在变异, 值得进行研究。

重庆药物种植研究所刘正宇先生惠赠金佛山紫草科植物标本, 孙英宝先生绘图, 作者深切感谢。

#### 参考文献:

王庆瑞. 1989. 附地草属 *Trigonotis* Stev. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 64(2): 77-106

(上接第 155 页 Continue from page 155)

- fragarioides* var. *sprengeliana* (Rosaceae) in Korea (在韩国境内 *Potentilla fragarioides* var. *sprengeliana* 的遗传多样性和种群结构) [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 42(1): 64-70
- Millar CI, Libby WJ. 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species [M] // Falk D A, Holsinger KE (eds). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press: 149-170
- Qian W, Ge S, Hong DY. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 102: 440-449
- Soltis PS, Soltis DE. 1991. Genetics variation in endemic and widespread plant species; Examples from Saxifragaceae and

- Polystichum* [J]. *Aliso*, 13: 215-223
- Xie ZW, Lu YQ, Ge S, et al. 2001. Clonality in wild rice, *Oryza rufipogon* (Poaceae) and its implications for conservation management [J]. *Amer J Bot*, 88: 1 058-1 064
- Yao Y, Tigerstedt PMA. 1993. Isozyme studies of genetic diversity and evolution in *Hippophae* [J]. *Genetic Res. Crop Evol*, 40: 153-164
- Yao Y, Tigerstedt PMA, Joy P. 1992. Variation of vitamin C concentration and character correlation between and within natural sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) population [J]. *Acta Agr Scand*, 42: 12-17
- Yeh EC, Yang RC, Boyle TBJ, et al. 1997. POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic analysis [M]. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada