

内蒙古白刺属植物遗传多样性的 RAPD 分析

宛 涛¹, 蔡 萍², 伊卫东¹, 张晓明³, 张辰波¹

(1. 内蒙古农业大学生物工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 锡林浩特牧业学院,

内蒙古 锡林浩特 026000; 3. 呼伦贝尔大学, 内蒙古 海拉尔 021008)

摘要: 利用随机扩增 DNA 多态性 (RAPD) 技术对 4 种不同地理种群的白刺属 (*Nitraria* L.) 植物进行了遗传多样性分析。15 个引物扩增出 118 个位点, 其中多态性位点 95 个 (80.5%), 各引物的 Nei's 指数和 Shannon's 多样性指数差别较大, 利用 UPGMA 方法构建分子系统树。结果表明: 白刺属植物的遗传分化程度和基因流因种而异, 除球果白刺以外, 其余 3 种白刺的种群间有很大的基因流, 其遗传一致度在 0.8561~0.9694 之间, 而种间遗传分化程度较低, 故 4 种白刺有着相近的祖先, 这与形态学和细胞学的分析结果一致, 说明 RAPD 分析方法可从分子生物学角度为白刺属植物的系统学分类提供更为有利和可靠的证据。

关键词: 白刺属; RAPD 分析; 亲缘关系; 遗传变异

中图分类号: S793.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2007)01-0225-05

白刺属 (*Nitraria* L.) 植物属于蒺藜科 (*Zygophyllaceae*) 的落叶灌木, 耐盐旱生植物, 多分布于亚洲、欧洲、非洲和澳洲。在我国主要分布于西北、华北和沿海地区^[1, 2], 是内蒙古西部干旱一半干旱荒漠、盐碱地和沙地等植被的主要建群种, 在维持荒漠生态系统平衡方面具有重要的作用^[3]。

20 世纪 90 年代发展起来的 RAPD、RFLP 等技术已经普遍应用在植物遗传资源的评价、种间遗传分化和居群生态学研究中。许多研究者利用这些新技术对诸多植物居群的遗传结构、种间分化、遗传变异和生态因子偶合关系进行了深入研究和探讨, 但是关于白刺属植物遗传多样性、种间分化的研究尚未报道。因此本文采用 RAPD 方法研究白刺属植物的遗传分化, 分析其种间关系、种群遗传结构。旨在从分子水平上解释白刺属植物的遗传进化, 并为白刺属植物的种源区划、选育以及保护生物学等研究提供分子水平的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所需的白刺属植物材料均采自内蒙古自治区境内的野生种, 每个居群随机抽取 20 个植株, 每个植株随机抽取嫩叶 4~5 片, 并置于 0~4°C 的环境下保鲜, 迅速运往实验室, 样品于 -70°C 低温冷冻保存。供试材料的详细情况见表 1。

1.2 试验方法

DNA 提取采用 CTAB 法^[4]稍加修改, 具体为:

取约 0.5 g 叶片放入研钵内, 加入液氮迅速研磨; 把研磨后的样品移至 7 ml 的离心管中, 加入 2 ml 细胞裂解液, 65°C 水浴 90 min, 期间充分混匀 3 次; 加入等量的氯仿/异戊醇 (24:1) 混合液缓慢混匀, 以 6 000 转/min (低温 4°C) 离心 10 min; 取上清液加入等量的 -20°C 异丙醇, 轻轻倒置混匀后静置几分钟, 待出现絮状沉淀; 回收絮状物后用 CTAB 回溶, 重复以上步骤两次; 把絮状 DNA 回收后用 75% 的乙醇漂洗两次晾干; 把提取的 DNA 溶于灭菌双蒸水中, 4°C 下保存备用。

RAPD-PCR 参照李宽钰等 (1997) 的方法^[5], 用 Biometro PCR 仪进行扩增。反应体系为 25 μL: 10×PCR Buffer 2.8 μL, 25 μmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 25 μmol/L dNTPs 0.25 μL, 1U Taq polymerase (上海生工), 3.57 μmol/L 随机引物 1 μL, 20 ng 模板 DNA, 灭菌双蒸水定容到 25 μL, 之后加两滴石蜡油。反应条件为: 94°C 预变性 5 min 后, 94°C 变性 1 min, 42°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 共 40 个循环, 然后 72°C 延伸 7 min。扩增产物采用 1.3% 琼脂糖 (加拿大 BBI 公司) 凝胶在 0.5×TBE 缓冲液中进行电泳分离, GIS-2008 凝胶显像仪下观察、记录并照相。

在电泳图谱上同一个位点, 有扩增条带出现计为 1, 无扩增带计为 0^[6], 作 0/1 矩阵输入计算机, 采用 POPGEN32 (加拿大 Alberta 大学编写) 进行遗传参数分析和种间聚类分析, 种间分化研究采用 UPGMA (非加权组成配对法, Unweighted-pair-

group method using an arithmetic average) 法建立系统聚类分枝树状图。

表 1 供试材料

Table 1 Materials used in this study

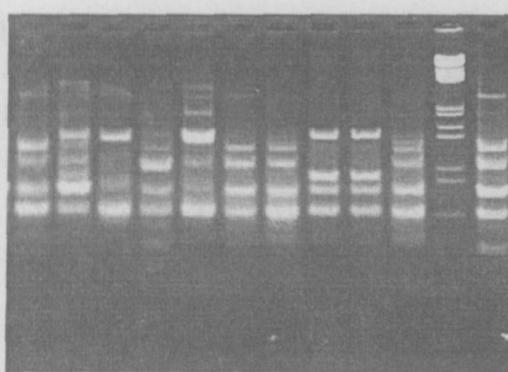
编号 Number	物种 Species	采集地 Locality	生境 Habitat	居群数 Populations
1	小果白刺 <i>N. sibirica</i>	乌拉特前旗、乌海、巴彦浩特、吉兰泰、巴彦诺日公、磴口 Wulateqianvillage, Wuhai, Bayanhaote, Jilantai, Bayannuorigong, Dengkou	轻度盐渍化低地、荒漠草原、荒漠地带 Light of degree salinize down land, hungry grassland, barren desert zone	3
2	白刺 <i>N. tangutorum</i>	磴口、乌海、巴彦浩特、河屯池、吉兰泰、巴彦诺日公 Dengkou, Wuhai, Bayanhaote, Hetunchi, Jilantai, Bayannuorigong	荒漠草原、荒漠地带 Hungry grassland, barren desert zone	2
3	球果白刺 <i>N. sphaerocarpa</i>	达赉库布、居延海 Dalaikubu, Juyanghai	沙砾质戈壁 Grit quality gobi desert	3
4	大白刺 <i>N. roborowskii</i>	河屯池、吉兰泰、巴彦诺日公、乌力吉、达赉库布 Hetunchi, Jilantai, Bayannuorigong, Wuliji, Dalaikubu	戈壁滩 Desert area	3

2 结果与分析

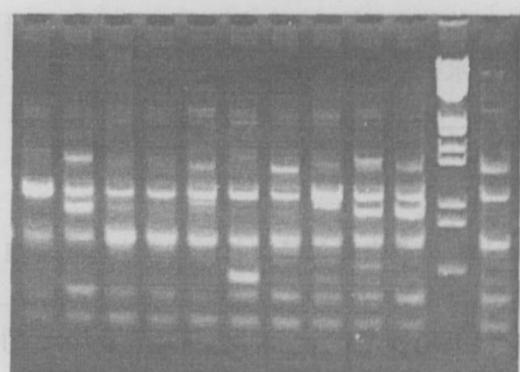
2.1 RAPD 多态性分析

从 86 个随机引物(上海生工公司合成)中选取 15 个能获得清晰条带, 反应稳定的引物, 例如 S42 和 S317 的 RAPD 扩增图谱(见图 1), 共检测到 118 个位点。各引物扩增带数为 3~11 不等(见表 2)。在检测的 4 个种群中 RAPD 标记片段表现出丰富的基因多样性, 植物种群间平均多态性比例达到 77.53%, 平均每个引物扩增出 7.89 个位点。其中球果白刺的多态性比例最高, 达到 80.50%, 大白刺

的多态性比例最低, 为 74.57%。检测的结果表明: 除大白刺外, 其它 3 种的各种群内都检测出约 72 个位点, 多态率都达到 70%以上, 最高的是球果白刺种群(采集于额济纳旗的达赉库布), 多态性比例达到 76.27%; 大白刺种群内检测到的多态位点较少, 最多为 86 个, 占 72.88%(采于阿拉善右旗的河屯池), 最少为 38 个, 占 32.2%(采于吉兰泰)。从 4 种白刺种群的多态位点分析可以看出白刺属植物的种内、种群内变异很广泛, 这可能是干旱和养分等胁迫以及荒漠异质环境下植物适应的遗传表现之一^[7~9]。



引物 S42 RAPD 扩增图谱
RAPD patterns amplified by primers S42



引物 S317 RAPD 扩增图谱
RAPD patterns amplified by primers S317

图 1 S42 和 S317 的 RAPD 扩增图谱

Fig. 1 RAPD patterns amplified respectively with the primers S42 and S317

表 2 引物及其序列和扩增结果

Table 2 List of fifteen primers, sequences, and amplification results

引物 Primers	序列 5' Sequence 3'	小果白刺 <i>N. sibirica</i>	白刺 <i>N. tangutorum</i>	球果白刺 <i>N. sphaerocarpa</i>	大白刺 <i>N. roborowskii</i>
OPD7	TTGGCACGGG	9/7	9/8	9/8	9/8
S3	CATCCCCCTG	7/7	7/7	7/6	7/7
S6	TGCGCCCTTC	5/4	5/3	5/4	5/4
S20	GGACCCATTAC	8/6	8/5	8/6	8/4
S24	AATCGGGCTG	9/7	9/7	9/7	9/7
S27	GAAACGGGTG	11/7	11/7	11/7	11/7
S37	GACCGCTTGT	8/6	8/6	8/6	8/6
S40	GTTGCGATCC	7/7	7/6	7/7	7/6
S42	GGACCCAACC	10/9	10/9	10/9	10/8
S79	GTTGCCAGCC	6/4	6/4	6/5	6/3
S267	CTGGACGTCA	7/5	7/3	7/5	7/5
S290	CAAACGTGGG	8/6	8/6	8/6	8/6
S307	GAGCGAGGCT	7/6	7/6	7/6	7/5
S317	GACACGGACC	9/7	9/6	9/7	9/6
S1299	CTCGATCACC	7/6	7/6	7/6	7/6
总和 Total		118/94	118/89	118/95	118/88
多态性比例 * Diversity		79.66%	75.42%	80.50%	74.57%

注: * 总扩增带数/多态性扩增带数。Note: * total amplification strip/polymorphic amplification strip.

2.2 遗传多样性分析

从琼脂糖凝胶电泳结果表明:白刺属植物 RAPD 扩增产物的分子量较大,一般为 500~3 500 bp,种群内平均每个位点的等位基因数都比较高,种群间差异不大,只有分布在吉兰泰的大白刺种群内平均每个位点的等位基因数比较低,详见表 3。

表 3 白刺属植物种群的 RAPD 分析的遗传多样性

Table 3 RAPD polymorphism of species of *Nitraria*

供试材料 Materials	多样性指数 Diversity index				
	na	ne	h	I	
小果白刺 <i>N. sibirica</i>	1	1.7288	1.5098	0.2872	0.4202
	2	1.7203	1.4796	0.2767	0.4087
	3	1.7373	1.4979	0.2830	0.4163
白刺 <i>N. tangutorum</i>	1	1.7373	1.5363	0.2990	0.4348
	2	1.7203	1.5135	0.2862	0.4173
球果白刺 <i>N. sphaerocarpa</i>	1	1.7627	1.5460	0.3037	0.4419
	2	1.7034	1.5393	0.2947	0.4253
	3	1.7203	1.5402	0.2996	0.4340
大白刺 <i>N. roborowskii</i>	1	1.2542	1.2246	0.1190	0.1679
	2	1.6356	1.4367	0.2490	0.3660
	3	1.7288	1.4854	0.2757	0.4059

注: na: 平均每个位点的等位基因数; ne: 平均每一个位点有效等位基因数; h: Nei's 基因多样性; I: Shannon's 信息指数。

Note: na: Observed number of alleles; ne: Effective number of alleles (Kimura and Crow; 1964); h: Nei's (1973) gene diversity; I: Shannon's Information index (Lewontin; 1972).

本研究中采用 Nei's 基因多样性度和 Shannon's 信息指数估计白刺属植物种群内的遗传变异程度。由表 4 中可以看出小果白刺、白刺和球果白刺的不同种群内遗传变异水平差异不大, Nei's 基因多样性度和 Shannon's 信息指数分别为 0.2823、0.2926、0.2951 以及 0.4151、0.4263、0.4337; 大白刺三个种群内的遗传变异程度有明显的差异, Nei's 基因多样性度和 Shannon's 信息指数分别为 0.1190、0.2490、0.2757 和 0.1679、0.3660、0.4059。4 种白刺属植物在不同物种与同一物种的不同种群之间, Nei's 基因多样性度和 Shannon's 信息指数有着相同的变化趋势。

2.3 群体间遗传关系分析

白刺属植物不同地理种群之间遗传分化程度的计算结果表明:不同地理种群的分化程度不同。用遗传分化系数来评价遗传变异来源^[10,11], 其结果是白刺的两个种群间分化程度最小, 只占总变异的 8.71%, 其次是小果白刺和球果白刺, 在总变异中分别占 10.07% 和 15.36%, 而种群间分化程度最明显的是大白刺的三个种群, 变异量占总变异的 28.94%。用遗传分化系数进一步计算基因流的结果:白刺的两个种群间的基因流最大, 其它白刺种群的基因流大小依次为小果白刺、球果白刺、大叶白刺。

不同种群的遗传度和遗传距离表明:4 种白刺属植物中,小果白刺三个种群的距离最近,大白刺三个种群的距离最远。该结果再次说明大白刺种群之间遗传分化比较明显^[12,13]。

2.4 种间遗传关系分析

不考虑划分的地理种群,根据种间多态位点对白刺属植物进行种间分化分析,可得出以下结果:扩增片段中种内共有片段数比较多,118 个位点中可找到 23 个种内共有的位点,占总位点的 19.49%;

而特有片段数比较少。计算种间的遗传一致度、遗传距离及根据多态位点利用 UPGMA 方法构建分子系统树的结果表明:小果白刺和白刺的遗传一致度较近,球果白刺和大白刺的遗传一致度最远;小果白刺和白刺的亲缘关系比较近,而大白刺和其它三种白刺的亲缘关系比较远(详见表 5、图 2)。由此可看出供试的 4 种白刺属植物是由共同祖先演化而来,而且亲缘关系比较近^[14~16]。

表 4 白刺属植物种群的遗传分化比较

Table 4 Compare the heredity polarization of *Nitraria*

供试材料 Materials	总种群内基因多样性 Ht	种内基因多样性 Hs	遗传分化系数 Gst	基因流 Nm
小果白刺 <i>N. sibirica</i>	0.3139(0.0365)	0.2823(0.0304)	0.1007	4.4666
白刺 <i>N. tangutorum</i>	0.3205(0.0398)	0.2926(0.0377)	0.0871	5.2405
球果白刺 <i>N. sphaerocarpa</i>	0.3487(0.0379)	0.2951(0.0327)	0.1536	2.7552
大白刺 <i>N. roborowskii</i>	0.3020(0.0387)	0.2146(0.0270)	0.2894	1.2277

表 5 白刺属植物的遗传一致度和遗传距离

Table 5 Heredity identical and distance of *Nitraria*

供试材料 Materials	小果白刺 <i>N. sibirica</i>	白刺 <i>N. tangutorum</i>	球果白刺 <i>N. sphaerocarpa</i>	大白刺 <i>N. roborowskii</i>
小果白刺 <i>N. sibirica</i>	* *	0.8690	0.8608	0.8315
白刺 <i>N. tangutorum</i>	0.1315	* *	0.8500	0.8369
球果白刺 <i>N. sphaerocarpa</i>	0.1400	0.1513	* * *	0.8117
大白刺 <i>N. roborowskii</i>	0.1709	0.1652	0.1924	* * *

注: * * 是遗传 Nei's 相似系数, * * * 是遗传距离。Note: * * is the Nei's heredity similar modulus, * * * is heredity identical.

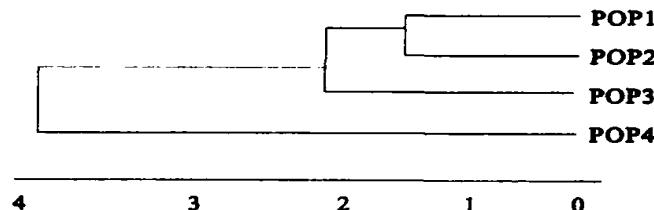


图 2 根据 Nei's 遗传距离构建的 4 种白刺系统进化树

Fig. 2 Construct system evolution tree of four *Nitraria* L. in base of Nei's heredity distance

注:POP1、POP2、POP3 和 POP4 分别代表小果白刺、白刺、球果白刺和大白刺。

Note: POP1, POP2, POP3 and POP4 respectively represent *N. sibirica*, *N. tangutorum*, *N. sphaerocarpa* and *N. roborowskii*.

3 讨 论

1) 利用 15 个引物对 4 种白刺属植物进行 RAPD 分析,检测到 118 个位点,不仅反映出这 4 种白刺属植物的遗传背景复杂、多样性丰富,还可计算出种群内的遗传变异、种群间的分化和种间的亲缘关系。因此, RAPD 技术是白刺属植物系统学研究的有效补充手段。

2) 周泽扬等^[18]的研究表明:在 RAPD 研究中,所分析的位点数多少,是关系到研究可行性和结果

可靠性的至关重要的问题。当位点数在 20 以下时,得到的遗传差异的结果极不可靠,随着位点数的增加所提供的信息量及可靠性增加。当位点数超过 70 个时,所提供的信息可靠性趋于稳定。本研究得到白刺属植物的位点数 118 个,因此本研究的结果较为可靠。

3) 多态位点百分率是普遍采用的度量遗传变异水平高低的指标^[17]。扩增的 DNA 片段出现频率小于 0.99 的位点为多态位点,检测到的位点中能反映变异水平的最直接的指标。从 4 种白刺种群的多

态位点分析可以看出白刺属植物的种内、种群内变异很广泛,这与其他学者在毛乌素沙地的柠条、羊柴、新疆典型荒漠区的梭梭和以色列进化谷的野大麦等试验中获得的研究结果相似,都有相对较高的多态比例现象,这可能是干旱和养分等胁迫及荒漠异质环境下植物适应的遗传表现之一^[7~9]。

4) 不同地理种群遗传多样性检测得出:白刺属植物有很高的种群内遗传多样性,而种群间遗传分化程度较低,有明显的基因流。这种遗传结构特征是白刺属植物在西部盐碱地和荒漠地区广泛分布的遗传基础。大白刺3个种群之间有遗传分化现象,这与生境恶化、采样群体大小以及地理隔离有关系,有待于进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 第四十三卷第一分册. 北京:科学出版社, 1998. 168.
- [2] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志[M]. (第二版). 第三卷. 呼和浩特:内蒙古人民出版社, 1987. 414—418.
- [3] 马全林. 濒危植物绵刺光合的生理生态学特征[J]. 西北植物学报, 1999, 19(6): 165—170.
- [4] 马兵钢, 牛建新. 库尔勒香梨基因组 DNA 提取及 RAPD 体系建立[J]. 新疆农业科学, 2001, 38(1): 18—22.
- [5] 李宽钰, 黄敏仁, 王明麻. 用 RAPD 探讨毛白杨起源[J]. 植物分类学报, 1997, 35(1): 24—31.
- [6] 周永红. 用 RAPD 分子标记探讨鹅观草属的种间关系[J]. 植物学报, 1999, 41(10): 1076—1081.
- [7] 魏 伟, 王洪新, 胡志昂, 等. 毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究: RAPD 证据[J]. 生态学报, 1999, (1): 16—22.
- [8] 葛颂, 王可青, 董 鸣. 毛乌素沙地根茎灌木羊柴的遗传多样性和克隆结构[J]. 植物学报, 1999, 41, (3): 301—306.
- [9] SHENG Yan, ZHENG Wei-hong, PEI Ke-quan. Population Genetic Structure of a Dominant Desert Tree, *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae), in the Southeast Gurbantunggut Desert Detected by RAPD and ISSR Markers[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(6): 675—681.
- [10] El-Kassaby Y A. Genetic variation within and among conifer populations: review and evaluation of methods[A]. Fineschi S, Malvolti M E and Cannata F, et al. Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees[C]. The Netherlands: The Hague, 1991. 61—76.
- [11] 钟 敏, 王洪新, 胡志昂, 等. 干旱和湿润生境条件下辽东栎群体的遗传结构及其适应意义的初步研究[J]. 植物学报, 1995, 37: 661—668.
- [12] Nybom H, bartish I v. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants[J]. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 2000, (3): 93—114.
- [13] 张爱兵, 谭声江, 陈建, 等. 空间分子生态学—分子生态学与空间生态学相结合的新领域[J]. 生态学报, 2002, 25(5): 664—681.
- [14] 董英山, 吕景良, 江相智. 东北地区栽培大豆品种资源分类探讨[J]. 大豆科学, 1998, 17(4): 311—317.
- [15] 孙立军, 吕耀昌, 孔繁玲, 等. 大麦高蛋白种质遗传稳定性分析[J]. 大麦科学, 2002, 3: 8—13.
- [16] 韩 路, 贾志宽, 韩清芳, 等. 苜蓿种质资源特性的灰色关联度分析与评价[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(3): 59—64.
- [17] 姜 静, 杨传平, 刘桂丰. 应用 RAPD 技术对东北地区白桦种源遗传变异研究[J]. 东北林业大学学报, 2001, 29(2): 30—34.
- [18] 周泽扬, 夏庆友, 鲁 成, 等. 分子系统学研究中分子位点数与遗传差异信息可靠性的关系[J]. 遗传, 1998, 20(5): 12—15.

RAPD analysis on genetic diversity of nitavia in inner mongolia

WAN Tao¹, CAI Ping², YI Wei-dong¹, ZHANG Xiao-ming³, ZHANG Chen-bo¹

(1. Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China;

2. Xilinhot Animal Husbandry College, Xilinhot 026000, China; 3. Hulunbeier University, Hailar 021008, China)

Abstract: Four species of *Nitraria* were analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. 15 random primers amplified 118 loci have 95 polymorphic loci, about 80.5%. The differentiates of Nei's gene diversity and Shannon's information index between each primers produced is big. Dendrogram was constructed using UPGMA. The result showed that the polarization of populations and gene fluxes are different in different species. The polarization and gene fluxes of populations of 3 *Nitavia*s are lower except *N. sphaerocarpa*. The heredity coherence of each population is change from 0.8561 to 0.9694. The polarization in the populations is low, and they have the together ancestor. This is similar to morphology and cytology result, so RAPD is a useful supplementary method in assessing genetic relationship among *Nitraria* species.

Keywords: *Nitraria* L.; RAPD; relationship; genetic variation