

长筒石蒜居群遗传多样性 RAPD 分析

邓传良¹, 刘建^{2,3}, 周坚²

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 南京 210037; 3. 广西林业科学研究所, 南宁 530000)

摘要: 利用 RAPD 标记对长筒石蒜 3 个居群的遗传多样性及分化程度进行了研究。12 条随机引物扩增出 94 个可分析位点, 多态位点比率 (PPB) 为 65.96%, 表明长筒石蒜具有比较高的遗传多样性。经 POPGENE32 分析表明: Nei's 基因多样性指数 (h) 为 0.1897, 香农多样性指数 (I) 为 0.2945, 基因分化系数 (G_{ST}) 为 0.1191, 基因流 (Nm) 为 3.6980。经 WINAMOVA 分析表明: 居群内遗传变异占 71.75%, 而居群间只占 28.25%。遗传多样性分析表明, 各居群的遗传多样性水平由高到低为琅琊山居群 > 宝华山居群 > 盱眙居群。遗传分化表明: 长筒石蒜各居群间遗传分化程度较低; 大部分遗传变异存在于居群内部, 表明其具有较强的进化潜力, 自然情况下不会处于濒危状态, 野生种质资源的破坏, 主要来自于人为干扰。

关键词: 长筒石蒜; 居群; 遗传多样性; 随机扩增多态性 DNA

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)03-0401-05

Analysis of population genetic diversity of *Lycoris longituba* (Amaryllidaceae) by RAPD

DENG Chuan-Liang¹, LIU Jian^{2,3}, ZHOU Jian²

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxing 453007, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. Guangxi Forestry Research Institute, Nanning 530000, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) method was applied to assess genetic diversity and population structure of *Lycoris longituba* indicated that *L. longituba* had a high level of genetic diversity. A total of 94 discernible loci were obtained for all populations using 12 primers, of which 63.02% were polymorphic ($PPB = 63.02\%$). As analyzed by POPGENE32, the results were showed as follows: average percentage of polymorphic loci ($PPB = 59.59\%$), Nei's gene diversity ($h = 0.1897$), Shannon's information index ($I = 0.2945$). The low value of differentiation ($G_{ST} = 0.1191$) showed that the differentiation among the populations was low. Result of analyzing of molecular variance (AMC, A) showed that 71.75% of genetic variance was found within populations and 28.25% of genetic variance among populations. The results indicated that *L. longituba* had strong evolution potential, under natural circumstance, which would not be in imminent danger. So the wild germplasm genetic resources breakage of *L. longituba* mainly came from artificial interference.

Key words: *Lycoris longituba*; population; genetic diversity; random amplified polymorphic DNA (RAPD)

长筒石蒜 (*Lycoris longituba*) 隶属于石蒜科 (Amaryllidaceae) 石蒜属, 自然分布在江苏 (后来发现在安徽也有分布), 为中国特有种 (中国科学院中

国植物志编辑委员会, 1985)。其花型大, 似百合, 花色很丰富。在我们收集的种质资源中, 有很多长筒石蒜的变异类型, 花色奇特, 并具罕见的淡绿色花,

收稿日期: 2005-09-05 修回日期: 2006-03-29

基金项目: 国家科技部“863”项目 (2002AA241051) [Supported by National High Technology Research and Development Program of China (2002AA241051)]

作者简介: 邓传良 (1975-), 男, 山东定陶人, 博士, 主要从事植物遗传学研究, (E-mail) DCL75@163.com。

而花型变异也很大,有的还具幽香,为杂交育种选配亲本提供了丰富的种质资源。同时,它也是优良的地被植物和切花材料(李淑顺等,2004)。有关石蒜属植物的研究,多集中在核型(刘琰等,1989)、花粉形态(任秀芳等,1995)、杂交育种(徐炳声等,1986)及亲缘关系(Hsu 等,1994;张露等,2002)等方面,而在居群遗传结构方面研究不多(Chung,1999)。天然居群遗传结构等的研究,有助于阐明植物变异的性质与环境的关系,对解决该植物系统与进化生物学问题,以及遗传育种与利用具有重要意义。

随机扩增的 DNA 多态性分析(RAPD)是 90 年代发展起来的一种快速、方便的分析不同个体间遗传差异的技术,可以直接对基因组 DNA 进行检测,已广泛应用于种内不同居群间亲缘关系的研究(杭

炎等,2004;钱韦等,2000;王中生等,2004;Xie 等,2004;Fahima 等,1999;Qian 等,2001)。本文利用 RAPD 技术对长筒石蒜的居群遗传结构进行研究,了解其遗传变异水平,有助于对其种质资源情况进行评价,进而采取有效的保护措施。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料长筒石蒜采集于安徽琅琊山林场、江苏盱眙铁山寺国家森林公园、江苏宝华山国家森林公园。根据 Chung(1999)研究石蒜居群遗传结构采样方法,每间隔 5 m 以上采集 5 个单株,作为一个小居群,每个采样地选取了 12 个亚居群,分别用硅胶

表 1 采集地与样品数目
Table 1 Origin and number of samples

居群 Population	代号 Code	采集地 Origin	生境 Habitat	样品数目 No. of samples
琅琊山居群 Langyashan population	LYS	安徽滁州琅琊山林场	林场附近,山坡石缝间	60
盱眙居群 Xuyi population	XY	江苏盱眙铁山寺国家森林公园	铁山禅寺附近,沟两旁石缝间	60
宝华山居群 Baohuashan population	BHS	江苏句容宝华山国家森林公园	隆昌寺附近,林下石缝	60

干燥,室温保存(表 1)。将每一个小居群的 5 个单株,等量混合,提取总 DNA(钱韦等,2000)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用改良 CTAB(Rogers 等,1988)和硅珠悬浮(Milligan,1998)两种方法对样品进行 DNA 提取,1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.2 RAPD 扩增 利用 3 份分别来自琅琊山林场、铁山寺国家森林公园、宝华山国家森林公园的材料进行预备实验,从 200 条随机引物(A、B、C、D、E、F、G、H、S、X 组,每组 20 条)筛选出 12 个能获得清晰条带,稳定的引物(A-10、A-16、B-18、C-04、D-20、E-17、E-19、F-05、G-15、X-2、X-4)用于进一步分析。扩增反应在美国 PE 公司 9600 扩增仪上进行,扩增反应总体积为 20 μ L:10 $\times$ Taq 酶扩增缓冲液 2 μ L (Tris-HCl 200 mmol/L pH8.3, KCl 500 mmol/L, 0.5% Triton-X 100),3 μ L Mg^{2+} (20 mmol/L),0.4 μ L dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 10 mmol/L),1 μ L 随机引物(Operon 公司产,10 μ mmol/L),0.75U Taq 聚合酶(上海 Promega 公司),DNA 模板 10~30 ng。扩增反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,进入 40 个 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,38 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s),最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

扩增产物加 2 μ L 上样缓冲液,用 0.5 μ g/ml 溴化乙锭(EB)染色,1.2%琼脂糖凝胶(5 V/cm)在 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中电泳分离,天能 UV-2 000 系列紫外分析仪中 300 nm 紫外灯下观察并照相。

1.2.3 数据统计分析 RAPD 是显性标记,同一引物扩增产物中迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点的产物并按扩增阳性(1)和扩增阴性(0)记录电泳带谱,形成 RAPD 表型数据矩阵用于进一步分析(钱韦等,2001)。为反映 RAPD 标记的多态性,统计各引物的多态条带比率(PPB),并利用 POPGENE32 软件(Yeh 等,1997)计算 RAPD 扩增产物的 Shannon 多样性指数 I 、等位基因数(na)、有效等位基因数(ne)和基因多样性指数(h)。另外,用 WINAMOVA 软件(张富民等,2002;Excoffier,1993)分析居群内与居群间的遗传变异水平。同时,利用 TFPGA 软件包(Mark 等,2000)计算遗传距离相似系数,并用 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果

2.1 引物筛选及 PCR 扩增结果

通过两次筛选,共得到 12 条扩增产物清晰且多

态性强的引物用于 RAPD 分析(图 1)。共得到随机扩增谱带 94 条,分子量基本都分布在 400~3 000 bp 之间,其中有多态谱带 62 个,占总的谱带比率为 65.96%(表 2),平均每个引物扩增出 5.2 条多态谱

带,表明长筒石蒜遗传多样性水平是比较高的。每个引物扩增的谱带不等,最多 10 个,最少 6 个,平均每个引物扩增出 7.8 条谱带。这表明长筒石蒜 DNA 多态性是丰富的,因此,利用 RAPD 标记能从

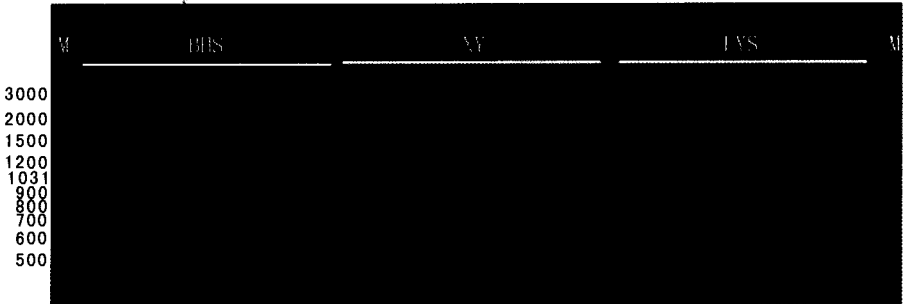


图 1 引物 OPA-16 对模板的扩增
Fig. 1 Amplified RAPD electrophoretic pattern of *Lycoris longituba* using primer OPA-16

表 2 RAPD 扩增结果
Table 2 Results of RAPD amplification

引物名称 Primer	引物碱基序列 Primer sequence	谱带 总数 Nb	多态谱 带数 Npb	多态谱 带比例 PPB (%)
OPA-10	5'GTGATCGCAG 3'	6	2	33.33
OPA-16	5'AGCCAGCGAA 3'	10	8	80.00
OPB-18	5'CCACAGCAGT 3'	7	3	42.86
OPC-04	5'CCGCATCTAC 3'	7	6	85.71
OPD-20	5'ACCGGTCAC 3'	6	3	50.00
OPE-17	5'CTACTGCCGT 3'	7	3	42.86
OPE-19	5'ACGGCGTATG 3'	7	4	57.14
OPF-05	5'CCGAATTCCC 3'	10	9	90.00
OPG-15	5'ACTGGGACTC 3'	10	8	80.00
OPS-01	5'CTACTGCGCT 3'	10	8	80.00
OPX-02	5'TTCCGCCACC 3'	7	4	57.14
OPX-04	5'CCGCTACCGA 3'	7	4	57.14
总计 Total		94	62	65.96

表 3 居群遗传指数
Table 3 Indices of population genetics

居群 Population	等位基因数 Observed number of alleles (<i>na</i>)	有效等位 基因数 Effective number of alleles (<i>ne</i>)	基因多样 性指数 Nei's gene diversity (<i>h</i>)	香农指数 Shannon's information index (<i>I</i>)
琅琊山居群 Langyashan population	1.585 1	1.292 9	0.177 1	0.272 2
盱眙居群 Xuyi popu- lation	1.414 9	1.247 8	0.148 1	0.222 4
宝华山居群 Baohuashan population	1.553 2	1.293 4	0.176 2	0.268 8
物种水平 Species level	1.659 6	1.308 1	0.189 7	0.294 5

DNA 水平上检测长筒石蒜居群的遗传结构。

2.2 居群遗传结构

POPGENE32 软件分析得到长筒石蒜居群遗传结构的 4 个指数:等位基因数(*na*)、有效等位基因数(*ne*)、基因多样性指数(*h*)和 Shannon 多样性指数 *I* (表 3)。此外,进行物种水平分析,得到总基因多样性 $Ht=0.189\ 7$,各居群基因多样性 $Hs=0.167\ 1$,基因分化系数 $G_{ST}=0.119\ 1$,基因流 $Nm=3.698\ 0$ 。

2.3 AMOVA 分析结果

AMOVA 分析结果表明大部分遗传变异存在于居群内(表 4)。

表 4 AMOVA 分析结果
Table 4 Results of Analysis of Molecular
Variance(AMOVA)

变异来源 Source of variation	变异期望 Variance expectation	比率 Percentage (%)	P 值 P value
居群间 Among populations	3.7713	28.25	<0.001
居群内 Within populations	9.5783	71.75	<0.001

注:1 000 次 permutation 显著性检测。

2.4 UPGMA 结果

TFPGA 软件包计算遗传距离相似系数,并用 UPGMA 法进行聚类分析,得到长筒石蒜不同居群的聚类图(图 2)。

4 讨论

4.1 居群内遗传多样性

本文用 RAPD 标记分析了长筒石蒜的遗传多

态性。根据等位基因数(na)、基因多样性指数(h)和香农多样性指数(J),各居群遗传变异由高到低为居群 LYS>BHS>XY,而有效等位基因数(ne)的分析结果有所不同,遗传多样性由高到低为居群 BHS>LYS>XY。

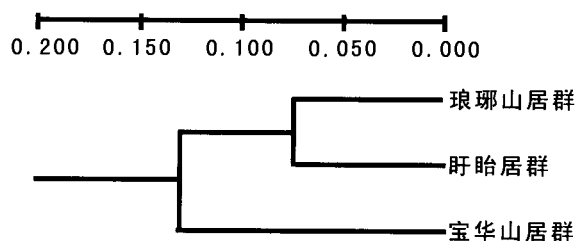


图 2 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrograms

石蒜属植物是单子叶植物中颇为特殊的类群,主要表现在:不同种的发叶期存在着显著差异,一部分种子秋末发叶而另一部分则于初春展叶,物候期相差数月,故区分为秋出叶种和春出叶种两类,但它们的开花期却基本一致;该属植物的营养生长期与生殖生长期是不连续的,即具有明显的阶段性,当夏季气温高于 25℃,叶片开始枯萎直至落叶,进入秋季,该属植物又陆续开花。因此呈现出有叶无花,有花无叶的奇特现象,这在显花植物中是十分罕见的(张露等,2002)。长筒石蒜是春出叶种,作者于 8 月份调查长筒石蒜的花色情况,结果表明:琅琊山居群及宝华山居群花色都非常丰富,有白色、粉红色、黄色、淡绿色等;花型变异也比较大,有大花型,也有小花型;有百合型,也有略微反卷型;花朵数目也有差异,有 5~7 朵,还有 10 朵以上。并且长筒石蒜在琅琊山分布最广,变异类型最多。而盱眙居群主要以白色为主,变异类型不太丰富。这与基于 RAPD 标记的分析结果一致,即不同居群表型的差异得到基因多样性的证实。

4.2 居群遗传结构

用 POPGENE32 分析的基因分化系数 G_{ST} 及用 AMOVA 进行的遗传变异分析都说明遗传变异大部分存在于居群内部,也即居群间没有产生显著的遗传分化。基因分化系数 $G_{ST} = 0.1191$,表明 11.91% 的遗传变异存在于居群间,而 88.09% 的遗传变异存在于居群内部。单子叶植物 G_{ST} 平均值为 0.231(Hamrick 等,1990),因此长筒石蒜各居群遗传分化偏低。同样,AMOVA 分析也表明,居群间的遗传变异占了 28.25%,居群内的遗传变异达到

了 71.75%。长筒石蒜居群内如此高的遗传变异水平,可能是因为长筒石蒜与石蒜属其它种进行杂交的结果。石蒜属植物在天然状态下极易杂交(Hsu 等,1994),且在长筒石蒜分布地域,存在着其它石蒜属种类,如中国石蒜(*L. chinensis*)、换锦花(*L. sprengeri*)、安徽石蒜(*L. anhuiensis*)等二倍体可育种,长筒石蒜与这些种之间可能会产生种间杂交,进而产生不同类型的变异。从基因流来分析,基因流(Nm)可通过 Wright 的公式 $F_{ST} = 1/(1 + 4Nm)$ 得到。公式中 Nm 表示每个世代所迁移个体的数量。长筒石蒜居群的基因流 Nm 为 3.6980。据报道,如果每代迁入个体数 $Nm > 4$,或更普遍地认为 $Nm > 1$,基因流就能抵制居群内遗传漂变的作用,也同时防止了居群分化的发生;若 $Nm < 1$,漂变就成为刻划居群遗传结构的主导因素(刘占林等,2001)。因此,长筒石蒜各居群间没有出现明显的分化。在植物中,基因流是借助于花粉、种子、孢子、营养体等遗传物质携带者的迁移或运动来实现的,其中花粉和种子的扩散和传播是两种最主要的形式(Hamrick,1987)。长筒石蒜既可以进行有性繁殖,又可以进行无性繁殖。不过,石蒜属植物种子与花粉传播能力有限,有性繁殖产生的个体只存在于 2~6 m 的空间内(Chung,1999),并且长筒石蒜分布区域之间间隔距离是比较大的。因此,长筒石蒜居群间的基因交流通过花粉与种子的扩散方式进行几率是很小的。但是,在琅琊山、盱眙及宝华山,长筒石蒜分布区域附近都有大的寺庙铁山禅寺、隆昌寺、琅琊寺,因此可以推断僧人可能在长筒石蒜传播中起到一定的作用。

4.3 种质资源的保护

保护物种,从某种意义上说,就是保护物种的遗传多样性或进化潜力。种内遗传多样性愈丰富,物种对环境变化的适应能力愈大,其进化潜力也就愈大。因此,了解物种遗传变异在空间上的分布格局对于制定科学的保护策略起着极为重要的作用。显然,对一个遗传变异主要分布于居群之间的物种和一个遗传变异主要分布于居群之内的物种应该有完全不同的取样和保护方针。在实际取样时,对于一个基因流比较小, G_{ST} 值为 0.60 的物种,至少要取样 6 个居群才能保护其 95% 的遗传多样性,而对于 G_{ST} 值为 0.20 的物种,要达到同样的效果只需取样 2 个居群就足够(葛颂,1997)。在本文的研究中,长筒石蒜居群间的 G_{ST} 值为 0.1191,这就意味着只需

取 1~2 个居群就可以了,但必须在居群内采集尽可能多的个体。因此,在天然状态下,长筒石蒜具有很大的进化潜力,不会自然灭绝,而是人为干扰对植物破坏较大。随着对石蒜属植物药用成分的研究,人们过多注意它的药用价值,对其进行无计划地采挖,使野生资源受到很大破坏。因此,尽快制定保护长筒石蒜野生资源的相应措施势在必行,且长筒石蒜的人工栽培蕴含巨大的市场前景和社会效益。

参考文献:

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1985. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,16(1):1-27
- 徐炳声,林巾箴,俞志洲,等. 1986. 从花粉的生活力和杂交后的结实率评价石蒜属内的种间关系[J]. 遗传学报,13(5):369-376
- 葛颂. 1997. 植物群体遗传结构研究的回顾和展望. 植物科学进展(第1卷)[M]. 北京:高等教育出版社
- Chung M. 1999. Clonal and spatial genetic structure in a population of the endangered herb *Lycoris sanguinea* var. *koreana* (Amaryllidaceae)[J]. *Genes Genet Systems*, 74(2):61-66
- Chung MG. 1999. Notes on allozyme variation in *Lycoris radiata* (Amaryllidaceae) from Korea[J]. *Bot Bull Acad Sin*, 40:227-230
- Excoffier L. 1993. Analysis of molecular variance(AMOVA) version 1.55. Genetics and Biometry Laboratory[M]. University of Geneva, Switzerland
- Fahima T, Sum GL, Beharav A, et al. 1999. RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel [J]. *Theor Appl Genet*, 98:434-447
- Hamrick JL. 1987. Gene flow, distribution of genetic variation in plant populations[M]//Urbanska K(ed). *Differentiation Patterns in Higher Plants*. New York:Academic Press;53-57
- Hamrick JL, Godt MJW. 1990. Allozyme diversity in plant species[M]//Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL(eds). *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sunderland;43-63
- Hang Y(杭炎), Jin Y(金燕), Lu BR(卢宝荣). 2004. Genetic diversity of the endangered species *Psathyrostachys huashanica* in China and its strategic conservation(濒危植物华山新麦草的遗传多样性及其保护)[J]. *J Fudan Univ(Nat Sci)*(复旦学报(自然科学版)), 43(2):260-266
- Hsu PS, Kurita S, Yu ZS, et al. 1994. Synopsis of the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae)[J]. *SIDA*, 16(2):301-331
- Li SS(李淑顺), Zhao JZ(赵九洲), Yuan E(袁娥). 2004. Appraising the ornamental characteristics of several species of *Lycoris* by gray-relational grade(几种石蒜属花卉观赏性状的灰色评价)[J]. *J Xuzhou Normal Univ(Nat Sci Edi)*(徐州师范大学学报(自然科学版)), 22(1):69-72
- Liu Y(刘琰), Hsu PS(徐炳声). 1989. A study on karyotypes of the genus *Lycoris*(石蒜属的核型研究)[J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 27(4):257-264
- Liu ZL(刘占林), Li S(李珊), Yan GQ(阎桂琴), et al. 2001. Genetic structure and intraspecific genetic polymorphisms in natural populations of *Psathyrostachys huashanica*(华山新麦草自然居群的遗传结构和种内遗传多态性研究)[J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 28(8):769-777
- Mark P, Miller. 2000. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data(TFPGA)[Z]. Department of Biological Sciences Northern Arizona University
- Milligan BG. 1998. Total DNA isolation[M]//Hoelzel(ed). *Molecular Genetic Analysis of Population*. 2nd ed. New York:Oxford University Press;29-64
- Qian W(钱韦), Ge S(葛颂), Hong DY(洪德元). 2000. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs(采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 42(7):741-750
- Qian W(钱韦), Ge S(葛颂). 2001. Analyses of population genetic structure by using dominant markers(居群遗传结构研究中显性标记数据分析方法探索)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 28(3):244-255
- 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
- Ren XF(任秀芳), Zhou SB(周守标), Zheng Y(郑艳), et al. 1995. Studies on the pollen morphology of the genus *Lycoris* in China(中国石蒜属花粉形态的研究)[J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 17(12):182-186
- Rogers SO, Bendich AJ. 1988. Extraction of DNA from plant tissues[J]. *Plant Mol Biol Manual*, A6:1-10
- Wang ZS(王中生), An SQ(安树青), Leng X(冷欣), et al. 2004. Population genetic diversity of the insular plant *Neolitsea sericea* based on random amplified polymorphic DNA(RAPD)(岛屿植物舟山新木姜子居群遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 24(3):414-422
- Xie L, Li LQ, Zhang DM. 2004. Assessment of genetic variation and distribution pattern of *Thalictrum petaloideum* detected by RAPDs[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 46(2):165-170
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, et al. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis[M]. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
- Zhang FM(张富民), Ge S(葛颂). 2002. Data analysis in population genetics. I. Analysis of RAPD data with AMOVA(群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD 数据的 AMOVA 分析)[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性), 10(4):438-444
- Zhang L(张露), Cai YM(蔡友铭), Zhuge Q(诸葛强), et al. 2002. Analysis of the inter-species relationships on *Lycoris* (Amaryllidaceae) by use of RAPD(石蒜属种间亲缘关系 RAPD 分析)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 29(10):915-921