

利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸与 鹅掌楸种间遗传多样性

罗光佐 施季森 尹佟明 黄敏仁 王明庠

(南京林业大学林木遗传与基因工程重点实验室, 南京 210037)

摘要: 利用 RAPD 标记技术对鹅掌楸属 (*Liriodendron* L.) 2 个现存种鹅掌楸 [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.] 和北美鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera* Linn.) 的遗传多样性进行分析, 结果表明: 2 个种都有较高的遗传多样性, 但北美鹅掌楸的遗传多样性水平高于鹅掌楸; 鹅掌楸的遗传变异主要来自地理种源内, 而北美鹅掌楸的遗传变异主要来自地理种源间; 与美国密苏里和路易斯安娜的北美鹅掌楸相比, 鹅掌楸的遗传距离更接近于南卡罗来那、北卡罗来那和佐治亚的北美鹅掌楸。

关键词: 北美鹅掌楸; 鹅掌楸; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: S792.21; Q948.12⁺2.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)02-0009-05

Comparison of genetic diversity between *Liriodendron tulipifera* Linn. and *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. by means of RAPD markers LUO Guang-zuo, SHI Ji-sen, YIN Tong-ming, HUANG Min-ren, WANG Ming-xiu (Forest Genetics and Gene Engineering Laboratory, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(2): 9~13

Abstract: Comparison of genetic diversity of the two living species of *Liriodendron* L. [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. and *L. tulipifera* Linn.] was conducted by means of RAPD markers. The results indicated that both species maintain a relatively high genetic diversity, the genetic variation level in *L. tulipifera* is higher than that in *L. chinense*, the diversity of the latter mainly exists within the provenance while that of the former mainly exists among the provenances. *L. chinense* is more close to the provenances of *L. tulipifera* in South Carolina, North Carolina and Georgia than those in Missouri and Louisiana of USA in genetic distance.

Key words: *Liriodendron tulipifera* Linn.; *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.; genetic diversity; RAPD

鹅掌楸属 (*Liriodendron* L.) 是木兰科植物, 在被子植物中处于原始而孤立的地位。本属在新生代尚有 10 余种, 广布于北半球, 第四纪冰期后大部分都已灭绝, 现仅残存鹅掌楸 [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.] 和北美鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera* Linn.) 2 个种, 成为东亚与北美洲间断分布的典型实例。鹅掌楸星散分布于长江流域以南的广阔地区, 共有 84 个分布点。多数分布点内的鹅掌楸种群个体数在 1~20 株之间, 较大的种群多分布于我国西部, 在自然群落中多为偶见种, 该种已被列为国家二级重点保护植物。北美鹅掌楸广布于北半球, 从加拿大南部到美国佛罗里达半岛中部, 从亚特兰大海岸到密西西比河流域都有分布。该种主要集中在阿巴拉契亚山南部, 而且通常形成连续种群。

与鹅掌楸相比, 北美鹅掌楸分布广泛而普遍, 种群个体数量较多, 是一个适应性很强的先锋树种。鹅掌楸和北美鹅掌楸虽同为一个属, 却有着绝然不同的生存状况^[1]。

近年来, 国内对鹅掌楸的繁殖与胚胎发育、花粉管生长与花粉传播及其生态和遗传等进行了大量的研究^[1-9]。Parks 等^[10]利用同工酶标记技术对北美鹅掌楸也进行了遗传分析。遗传多样性是生物多样性的基础和前提, 一个物种没有遗传多样性就不能进化, 也无法适应其生存环境的变化。遗传多样性

收稿日期: 1999-12-31

基金项目: 国家自然科学基金项目资助, 批准号: 39770628

作者简介: 罗光佐, 男, 1975 年 11 月生, 湖北监利人, 硕士在读, 主要从事林业生物技术研究。

是一个物种对人为干扰进行成功反应的决定性因素,种内的遗传变异程度也决定其进化的潜势^[11]。遗传多样性可以通过不同的方法进行检测,本研究利用 RAPD 分子标记技术,从 DNA 水平上对鹅掌楸和北美鹅掌楸的遗传多样性水平及变异来源等进行了比较和分析,试图为合理收集利用鹅掌楸属的基因资源以及合理选择亲本进行遗传改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

为研究 2 个种的遗传差异,采用了多种群小样本的取样策略。鹅掌楸有浙江、湖北、贵州、湖南、四川和江西 6 个地理种源;北美鹅掌楸有美国密苏里、路易斯安娜、南卡罗来那、北卡罗来那和佐治亚 5 个地理种源。样本取自南京林业大学林木遗传育种教研室建立的鹅掌楸种源实验林,每个地理种源取 8 个不同的样本。开春时采集初展幼叶用于 DNA 提取。

1.2 总 DNA 的提取和浓度测定

DNA 提取按照 Couch 等^[12]的方法稍加改进。将 1~2 g 幼叶放入研钵中加入液氮研磨,然后转入 10 mL 离心管中,加入 2 mL SDS DNA 提取液(100 mmol/L Tris(pH 8.3), 5 mmol/L EDTA(pH 8.3), 500 mmol/L NaCl, 1.5% SDS, 350 mmol/L β -巯基乙醇),充分摇匀后于 60~65℃ 保温 20~30 min,加入 700 μ L 5 mol/L KAc,充分摇匀,冰浴 30 min, 8 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入 10 mL 离心管中,加入酚:氯仿(1:1)3 mL,充分摇匀,8 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入另一 10 mL 离心管中,加入 3 mL 氯仿,摇匀,8 000 r/min 离心 10 min,将水相转移至新的 10 mL 离心管中,加入 6 mL 无水乙醇,轻轻摇匀,将离心管置于冰箱中于 -20℃ 下沉淀 DNA 30 min,用广口吸管将浮起的成团沉淀物吸出,转入 1.5 mL 离心管中,10 000 r/min 离心 10 min,倒掉水相,用 1 mL 70% 乙醇洗沉淀 2 次,然后用无水乙醇洗沉淀 1 次,将离心管倒置在吸水纸上,于空气中干燥,将沉淀物溶于 100 μ L 1×TE 中,于 -70℃ 存贮。DNA 浓度用琼脂糖凝胶比色法与标准浓度的 λ DNA 比较确定。

1.3 引物筛选

首先用一个 DNA 样品对 96 个寡核苷酸引物(购自 Operon 公司)进行第一次筛选,选出有扩增谱带且谱带清晰的 52 个引物;然后用 6 个 DNA 样品对其进行第二次筛选,选出多态性较强的引物用于北美鹅掌楸和鹅掌楸的遗传多样性检测。

1.4 PCR 扩增

RAPD 扩增反应在 Perkin-Elmer 9600 基因扩增仪上进行。参考尹佟明等^[13]的 RAPD 扩增反应条件:94℃ 预变性 2 min;然后进入 38 个循环,每个循环 94℃ 变性 30 s, 40℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min;循环完成后于 72℃ 延伸 7 min,最后于 4℃ 下保存。反应体系(体积为 20 μ L)组成如下:5 ng 左右的模板 DNA, 10 pmol 引物, dNTP 的量各为 100 μ mol/L, 2 μ L 10× 反应缓冲液[100 μ mol/L Tris-HCl (pH 8.3), 500 μ mol/L KCl, 20 mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶, 5.0 g/L BSA], 1U Taq 酶。扩增产物在 1% 含溴化乙锭的琼脂糖凝胶中电泳分离,最后在紫外灯下用 Polaroid 摄像系统拍照记录结果。

1.5 扩增产物的分析

1.5.1 RAPD 扩增谱带的记录 RAPD 扩增谱带见图 1,用“1”代表有带,用“0”代表无带,模糊不清或缺失时记录为“-”。

1.5.2 遗传多样性分析 本研究所用的分析软件为 POPGENE32。

1.5.2.1 遗传多样性水平的度量 以各基因位点的等位基因频率为基本数据,计算有效等位基因数 N_e 、基因多样性 H 和 Shannon 信息指数 I ,再分别求各种群的平均值。

1.5.2.2 遗传分化程度的度量 为了确定遗传变异在种群间和种群内的分布情况,采用 F-统计量对种群遗传变异进行基因多样度的分析,并根据遗传距离 D 采用类平均聚类法(UPGMA, PHYLIP Version 3.5)对 11 个种群进行聚类分析。

2 结果与分析

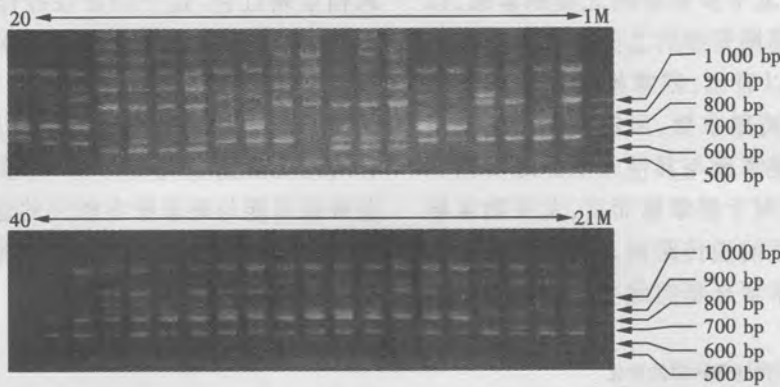
2.1 RAPD 引物的筛选及 PCR 扩增结果

通过对引物的两次筛选,从 96 个引物中共选出 21 个多态性较强且扩增产物清晰的引物用于 RAPD 分析,共获得 203 个位点,其中多态性位点 97 个,引物名称及检测的多态位点数见表 1。

2.2 遗传多样性水平

北美鹅掌楸和鹅掌楸的遗传多样性水平见表 2,可以看出,北美鹅掌楸和鹅掌楸都具有较高的遗传多样性。两者相比,北美鹅掌楸的有效等位基因

数平均值、基因多样性平均值、Shannon 信息指数平均值均高于鹅掌楸,因此北美鹅掌楸遗传多样性水平要高于鹅掌楸,但二者并没有显著差异。



M: 分子量标记 Molecular weight marker; 1~20: 北美鹅掌楸样品 *Liriodendron tulipifera* under analyzing; 21~40: 鹅掌楸样品 *L. chinense* under analyzing

图 1 引物 K10 的 RAPD 扩增产物在部分鹅掌楸属植物样品中的分离

Fig. 1 Segregation of RAPD bands amplified with primer K10 in some samples of *Liriodendron L.*

表 1 用于检测北美鹅掌楸和鹅掌楸遗传多样性的引物名称及其检测多态位点数

Table 1 The primers and their polymorphic loci in analyzing genetic diversity of *Liriodendron tulipifera* and *L. chinense*

引物名称 Primer	位点总数 Loci	多态位点数 Polymorphic loci	引物名称 Primer	位点总数 Loci	多态位点数 Polymorphic loci	引物名称 Primer	位点总数 Loci	多态位点数 Polymorphic loci
A11	9	5	K08	12	6	K19	9	3
J04	10	5	K10	9	7	L07	10	6
J05	10	4	K11	12	5	L09	8	5
J11	7	2	K15	11	4	L13	7	2
J12	8	4	K16	10	5	M06	11	4
J13	10	4	K17	11	8	N19	9	5
K01	15	5	K18	6	2	N20	9	6

2.3 遗传分化程度

2.3.1 F-统计量 北美鹅掌楸和鹅掌楸不同地理种源的分化见表 3,可以看出,鹅掌楸各种群总的基因多样性比北美鹅掌楸低,鹅掌楸各种群间的基因多样性和种群间基因分化指数都远远低于北美鹅掌楸。鹅掌楸的遗传变异主要存在于地理种源内,而北美鹅掌楸地理种源间的变异大于地理种源内的变异。本研究得出的变异水平与变异来源与朱晓琴等^[8]利用同工酶标记技术对鹅掌楸的研究结果相近。在本研究中,鹅掌楸各种群总的基因多样性为 0.40,其种群内变异占总变异量的 89%,而种群间变异仅占变异量的 11%。朱晓琴等的研究结果显示出鹅掌楸各种群总的基因多样性为 0.50,其种群内变异占总变异量的 86%,种群间变异占总变异量的

14%,两个研究结果表现出较好的一致性。鹅掌楸地理种源间变异量所占的比例相对于其他异交树种^[14]而言明显偏高。

表 2 北美鹅掌楸和鹅掌楸遗传多样性各度量平均值

Table 2 The mean parameters of genetic diversity of *Liriodendron tulipifera* and *L. chinense*

种类 Species	有效等位 基因数 Effective number of alleles	基因 多样性 Gene diversity	Shannon 信息指数 Shannon's information index
北美鹅掌楸 <i>Liriodendron tulipifera</i>	1.808 2	0.433 1	0.618 9
鹅掌楸 <i>Liriodendron chinense</i>	1.685 9	0.395 5	0.580 6

2.3.2 聚类分析 利用获得的 RAPD 多态标记对北美鹅掌楸和鹅掌楸的不同地理种源进行聚类分析(见图 2)。聚类稳定性分析结果表明当标记位点数

超过 73 个时,所获得的聚类结果完全一致,说明本研究所获得的多态标记数目对整个基因组有很好的代表性。本研究中 11 个种群大致可分为 3 个聚类群:即来源于中国浙江等 6 省的鹅掌楸,来源于美国南卡罗来那、佐治亚和北卡罗来那的北美鹅掌楸,以及来源于密苏里和路易斯安娜的北美鹅掌楸。

从聚类图上也可以看出,鹅掌楸种内种群间的分化程度明显低于北美鹅掌楸,虽然来源于密苏里和路易斯安娜的北美鹅掌楸与其他来源的北美鹅掌楸遗传距离较远,但相对于鹅掌楸而言,北美鹅掌楸不同种源间仍具有较近的遗传距离。但是来源于南卡罗来那、佐治亚、北卡罗来那的北美鹅掌楸与鹅掌

楸的遗传距离比来源于密苏里和路易斯安娜的北美鹅掌楸遗传距离更近。因此,鹅掌楸属是否完全按照大的地理来源划分为鹅掌楸和北美鹅掌楸 2 个种值得深入研究。在林业生产实践中,北美鹅掌楸的嫩梢呈暗红色,这一特征往往作为经验用于 2 个种在幼苗期的区分。然而,在鹅掌楸的某些种源中也具有嫩梢呈暗红色的特征。He 等^[15]对中国四川酉阳天然鹅掌楸种群进行研究后,发现它兼有 2 个种的同工酶酶谱特征。所以,推测北美鹅掌楸的某些种源可能与鹅掌楸有相同的起源。而北美鹅掌楸的另一一些种源可能有不同的起源中心或经历了严重的遗传漂变。

表 3 北美鹅掌楸和鹅掌楸不同地理种源的分化

Table 3 The provenance differentiation of *Liriodendron tulipifera* and *L. chinense*

种类 Species	种类的基因多样性 Genetic diversity of species	种群内基因多样性 Genetic diversity within populations	种群间基因多样性 Genetic diversity among populations	种群间基因分化系数 Coefficient of gene differentiation
北美鹅掌楸 <i>Liriodendron tulipifera</i>	0.433 3	0.157 9	0.275 4	0.635 5
鹅掌楸 <i>Liriodendron chinense</i>	0.400 0	0.358 0	0.037 4	0.094 6

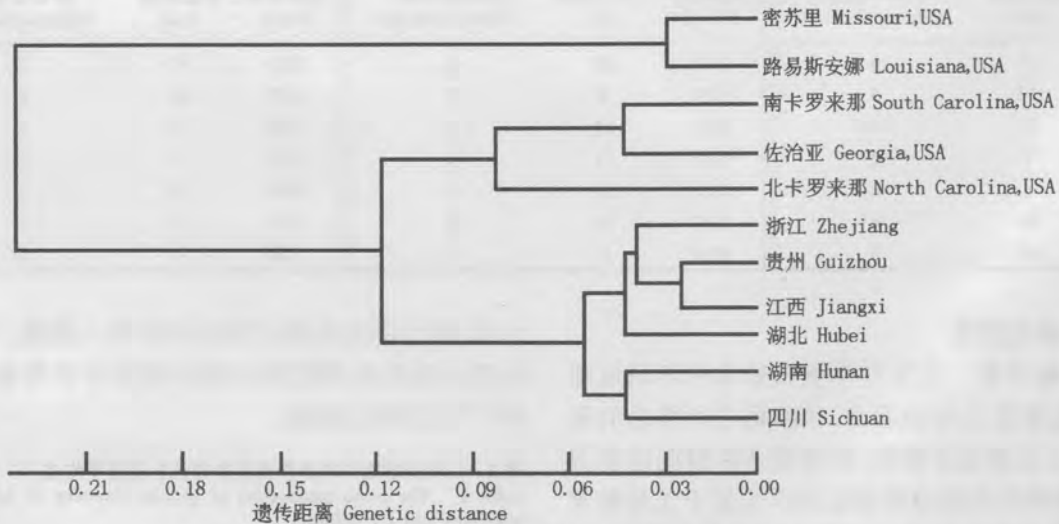


图 2 北美鹅掌楸和鹅掌楸 11 个种群的系统聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 11 populations of *Liriodendron tulipifera* and *L. chinense*

3 讨论

随着分子生物学技术的迅速发展,群体遗传结构的研究方法也由过去的形态标记、细胞学标记和生化标记发展到分子标记。其中 RAPD 遗传标记技术因有简便、快速、易操作等优点而被广泛应用于林

木群体遗传结构的研究。Yeh 等^[16]利用 RAPD 技术研究了欧洲山杨(*Trenibling aspen*) 8 个天然群体 249 个个体后得出,该种的群体遗传变异较大,Shannon 信息指数平均为 0.65。苏晓华等^[14]对 7 个大青杨(*Populus ussutionsis* Kom.)天然群体进行了 RAPD 标记研究后,得出其 Shannon 信息指数平均为 0.310。从本研究的结果得出鹅掌楸和北美鹅

掌楸的 Shannon 信息指数分别为 0.58 和 0.62。97 个多态性位点的基因多样性平均值分别为 0.40 和 0.43, 都具有较高的遗传多样性水平。这 2 个种的两个度量值均超过或与林木天然群体同类研究的结果相当^[17]。黄双全等^[5]的研究结果表明, 鹅掌楸的自花授粉率和结实率很低, 可以忽略, 因此异交特性是维持其较高遗传多样性的主要因素。

北美鹅掌楸地理种源间的变异(63%)占总变异的份量比其他异交树种偏高, 这一结果相对于 Parks 等^[10]的对北美鹅掌楸的研究结果也偏高。Parks 等指出, 北美鹅掌楸不仅分布广泛而且通常形成较大的连续种群, 很少呈散分布, 种群内的个体数量很

大, 不象鹅掌楸那样种群内个体数量通常很少, 该研究结果可能与相对于种群大小而言取样量较少有关。

郝日明等^[1]在对鹅掌楸的自然分布进行研究后认为, 鹅掌楸依照地理区域可划分为“一带五岛”的分布形式, 并认为鹅掌楸的分布形式反映了一个走向濒危的物种在数量上的减少过程。张大勇等^[11]认为濒危物种的遗传多样性可能会由于遗传漂变和近交作用而丧失, 但本研究表明鹅掌楸具有较高的遗传多样性, 这也证明了遗传多样性的丧失更可能是濒危的最终结果而不是濒危的起因, 其濒危的环境可能主要是由其本身的繁殖障碍导致的。

参考文献

- [1] 郝日明, 贺善安, 汤诗杰, 等. 鹅掌楸在中国的自然分布及其特点[J]. 植物资源与环境, 1995, 4(1): 1~6.
- [2] 樊汝汶, 叶建国, 尹增芳, 等. 鹅掌楸种子和胚胎发育的研究[J]. 植物学报, 1992, 34(6): 437~442.
- [3] 方炎明, 尤录祥, 樊汝汶. 中国鹅掌楸天然群体与人工群体的生育力[J]. 植物资源与环境, 1994, 3(3): 9~13.
- [4] 周 坚, 樊汝汶. 鹅掌楸属两种植物花粉品质和花粉管生长的研究[J]. 林业科学, 1994, 30(5): 405~411.
- [5] 黄双全, 郭友好, 陈家宽. 渐危植物鹅掌楸的授粉率及花粉管生长[J]. 植物分类学报, 1998, 36(4): 310~316.
- [6] 黄双全, 郭友好, 陈家宽, 等. 用 RAPD 方法初探鹅掌楸的花粉流[J]. 科学通报, 1998, 43(14): 1517~1519.
- [7] 贺善安, 郝日明, 汤诗杰. 鹅掌楸致濒的生态因素研究[J]. 植物资源与环境, 1996, 5(1): 1~8.
- [8] 朱晓琴, 马建霞, 姚青菊, 等. 鹅掌楸(*Liriodendron chinense*) 遗传多样性的等位酶论证[J]. 植物资源与环境, 1995, 4(3): 9~14.
- [9] 朱晓琴, 贺善安, 姚青菊, 等. 鹅掌楸居群遗传结构及其保护对策[J]. 植物资源与环境, 1997, 6(4): 7~14.
- [10] Parks C R, Wendel J F, Sewell M M, et al. The significance of allozyme variation and introgression in the *Liriodendron tulipifera* Complex (Magnoliaceae)[J]. American Journal of Botany, 1994, 81(7): 878~889.
- [11] 张大勇, 姜新华. 遗传多样性与濒危植物保护学研究进展[J]. 生物多样性, 1999, 7(1): 31~37.
- [12] Murray H G, Thomson W F. Rapid isolation for high molecular weight DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 8: 4321~4325.
- [13] 尹佟明, 何 平, 翟文学, 等. 利用 RAPD 标记和 F1 群体构建响叶杨×银白杨分子标记连锁图谱[J]. 植物学报, 1999, 41(9): 956~961.
- [14] 苏晓华, 张绮纹, 郑先武, 等. 利用 RAPD 分析大青杨天然群体的遗传结构[J]. 林业科学, 1997, 33(6): 504~511.
- [15] He S A, Yang Z B, Gu Y et al. Ex situ conservation in Nanjing Botanical Garden[A]. In: He S A, Heywood V H and Ashton P S (chief editors). Proceedings of the International Symposium on Botanical Gardens[C]. Nanjing: Jiangsu Science & Technology Publishing House, 1990. 63~81.
- [16] Yeh F C, Chong D K X, Yang R C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta [J]. The Journal of Heredity, 1995, 86(6): 454~459.
- [17] Hamrick J L, Godt M J. Allozyme diversity in plant species [A]. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. (eds.). Plant population genetics, breeding, and genetic resources [M]. Sunderland MA: Sinauer, 1990. 43~63.

(责任编辑:宗世贤)