

4 种红豆杉属植物遗传多样性和遗传关系的 RAPD 分析

郑超, 别庆铃, 夏冰, 彭峰, 汪仁, 郑玉红^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014]

摘要: 采用 RAPD 标记研究了分属于 4 种红豆杉属 (*Taxus* Linn.) 植物的 68 个单株的遗传多样性, 并采用 UPGMA 方法分析 68 个单株的遗传关系。结果表明: 12 条 RAPD 引物共扩增出 109 条带, 其中多态性条带 108 条, 多态性条带百分率为 99.1%; 平均每条引物扩增出 9.1 条带。南方红豆杉 [*T. wallichiana* var. *mairei* (Lemée et Lévl) L. K. Fu et Nan Li.] 种内的多态性条带百分率和观察等位基因数均最高; 欧洲红豆杉 (*T. baccata* Linn.) 种内的有效等位基因数、Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数均最高; 须弥红豆杉 (*T. wallichiana* Zucc.) 种内的各项遗传多样性指数均最低。供试 4 种植物的种内遗传多样性、种间遗传多样性、基因流和种间遗传分化系数分别为 0.174 5、0.358 6、0.401 7 和 0.554 5, 表明 55.45% 的遗传变异发生在种间。南方红豆杉和须弥红豆杉遗传距离最近; 曼地亚红豆杉 (*Taxus × media* Rehd.) 和须弥红豆杉的遗传距离最远。通过聚类分析可将 68 个单株分为 3 组, 欧洲红豆杉的 18 个单株和曼地亚红豆杉的 18 个单株分别各自聚为 1 组; 须弥红豆杉的 16 个单株和南方红豆杉的 16 个单株聚为 1 组, 其中须弥红豆杉的 16 个单株和南方红豆杉的 16 个单株又各自聚为 1 个亚组, 且南方红豆杉的雌、雄单株也分别聚在同一分支上, 表明须弥红豆杉和南方红豆杉遗传关系较近, 而欧洲红豆杉与其他 3 种植物的遗传关系较远。

关键词: 红豆杉属; RAPD 标记; 遗传多样性; 遗传关系; 聚类分析

中图分类号: Q347; Q346+.5; S791.49 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2013)03-0058-05
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2013.03.09

RAPD analysis of genetic diversity and genetic relationship of four species in *Taxus* Linn.

ZHENG Chao, BIE Qingling, XIA Bing, PENG Feng, WANG Ren, ZHENG Yuhong^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2013, 22(3): 58-62

Abstract: By means of RAPD marker, genetic diversity of sixty-eight individuals belonging to four species in *Taxus* Linn. was studied, and their genetic relationship also was analyzed by UPGMA cluster method. The results show that 109 bands are amplified by 12 RAPD primers, in which, 108 bands are polymorphic bands with 99.1% of percentage of polymorphic band, and average number of bands amplified by each primer is 9.08 bands. Percentage of polymorphic band and observed number of alleles of intraspecies of *T. wallichiana* var. *mairei* (Lemée et Lévl) L. K. Fu et Nan Li. are the highest, effective number of alleles, Nei's genetic diversity and Shannon's information index of intraspecies of *T. baccata* Linn. are the highest; while all genetic diversity indexes of *T. wallichiana* Zucc. are the lowest. Intraspecies genetic diversity, interspecies genetic diversity, gene flow and interspecies gene differentiation index of four species tested are 0.174 5, 0.358 6, 0.401 7 and 0.554 5, respectively, meaning that 55.45% of genetic variation exists among species. Genetic distance between *T. wallichiana* var. *mairei* and *T. wallichiana* is the nearest, while that between *T. × media* Rehd. and *T. wallichiana* is the farthest. Sixty-eight individuals can be divided into three groups by cluster analysis, eighteen

收稿日期: 2012-10-13

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE2010417); 2012 年江苏省农业自主创新资金项目 [CX(12)2041]; 特色观赏植物 (彩叶、常绿和观花木本等) 资源收集和利用研究特色业务建设项目 (BM2012058); 2012 年苏北科技发展计划项目 (BN2012078)

作者简介: 郑超 (1987—), 女, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究。

^①通信作者 E-mail: friend266@163.com

individuals of *T. baccata* and eighteen individuals of *T. × media* can be independently clustered into one group, respectively. And sixteen individuals of *T. wallichiana* and sixteen individuals of *T. wallichiana* var. *mairei* are gathered into one group, each in which is also gathered independently to form into one sub-group, respectively, while female and male individuals of *T. wallichiana* var. *mairei* are gathered into the same branch, respectively. It means that relationship between *T. wallichiana* and *T. wallichiana* var. *mairei* is more close while *T. baccata* has a further relationship with other three species.

Key words: *Taxus* Linn.; RAPD marker; genetic diversity; genetic relationship; cluster analysis

红豆杉 (*Taxus* spp.) 又称紫杉, 为红豆杉科 (Taxaceae) 红豆杉属 (*Taxus* Linn.) 种类的统称, 全世界约有 9 种; 主要以风媒传播为主, 种间无严格生殖隔离, 人工栽培历史悠久且树龄较长^[1], 主要分布于北半球的中纬度地区, 是第四纪冰川遗留下来的古老树种, 在地球上已存在约 250 万年。在自然条件下红豆杉生长缓慢, 种群竞争力和再生能力较差, 因而其野生资源匮乏, 在很多国家被列为珍稀濒危物种且禁止采伐。中国共有红豆杉属植物 3 种 2 变种, 分别是东北红豆杉 (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.)、密叶红豆杉 (*T. fuana* Nan Li et R. R. Mill)、须弥红豆杉 (*T. wallichiana* Zucc.)、红豆杉 [*T. wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin] 和南方红豆杉 [*T. wallichiana* var. *mairei* (Lemée et Lév.) L. K. Fu et Nan Li], 均为珍稀濒危保护植物^[2-3]。

分子标记方法常用于植物遗传多样性评价以及连锁图谱、品种鉴定、基因定位和功能进化等方面的研究^[4]。Godwin 等^[5]认为: 在基因组研究不足的情况下, 可采用 RAPD 标记方法进行物种鉴别, 该方法具有较为简单迅速和灵敏度高的特点, 研究成本相对较少。Collins 等^[6]的研究结果显示: 在进行欧洲红豆杉 (*T. baccata* Linn.)、东北红豆杉和加拿大红豆杉 (*T. canadensis* Marshall) 遗传多样性的研究时采用 RAPD 标记非常有效; Zarek^[7]采用 RAPD 标记研究了欧洲红豆杉的遗传多样性和遗传结构, 认为 RAPD 标记可以提供大量有效的群体遗传变异信息, 体现种间和种内的变异分配; Mohapatra 等^[8]的研究结果表明: RAPD 标记能有效分析须弥红豆杉种及种群等不同水平的遗传多样性状况; Zamani 等^[9]通过对不同基因型欧洲红豆杉的研究, 认为 RAPD 标记方法可用于关系非常相近的 2 个品种间的鉴别及多态性分析; 张玲玲^[10]采用 RAPD 标记研究了南方红豆杉的遗传多样性, 获得的结果与采用其他标记方法得到的结果一致。因而, RAPD 标记具有较高的准确性, 能够为遗传变异、种质保存及居群结构的研究提供可靠依据。

作者采用 RAPD 标记方法, 对来源于南方红豆杉、曼地亚红豆杉 (*Taxus × media* Rehd.)、欧洲红豆杉和须弥红豆杉群体的 68 个单株的遗传关系和遗传多样性进行了研究, 以期了解不同红豆杉群体间以及群体内的遗传多样性及遗传变异状况, 为红豆杉资源的开发和保护提供分子生物学研究依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 16 株 (包括雄株 6 株和雌株 10 株) 南方红豆杉和 18 株曼地亚红豆杉来源于江苏省·中国科学院植物研究所苗圃, 18 株欧洲红豆杉和 16 株须弥红豆杉由红豆杉生物科技公司提供并种植于无锡红豆集团苗圃基地, 共 68 个单株。按单株取样, 于 2011 年 4 月采集各单株当年生枝条上的嫩叶, 用硅胶干燥并置于塑封袋中带回实验室, 备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 提取 采用植物基因组快速提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 提取基因组总 DNA, 用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度, -20 °C 保存、备用。

1.2.2 RAPD 扩增 从上海生物工程技术有限公司设计生产的 50 个 RAPD 引物中筛选扩增条带丰富、信号强的 12 个 RAPD 引物进行 PCR 扩增。用 Eppendorf AG 22331 梯度 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司) 进行扩增。扩增体系总体积为 20 μL, 包含 1 × PCR buffer、MgCl₂ 2 mmol · L⁻¹、dNTPs 200 μmol · L⁻¹、模板 DNA 50 ng、Taq DNA 聚合酶 1 U 和引物 0.5 μmol · L⁻¹, 用灭菌双蒸水补足至 20 μL。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s、36 °C 退火 45 s、72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 最后于 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 并用 0.1% EB 染色后, 用 WV-BP330 型全自动凝胶成像系统 (江苏捷达科技发展有限公司) 拍照。

1.3 数据分析

根据电泳图谱中 DNA 条带的有无(有条带记为“1”、无条带记为“0”)将 RAPD 扩增结果转化为二元数据矩阵,并计算 4 种植物的多态性。应用 POPGENE v1.31 软件^[11]计算观察等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)^[12]、多态性条带百分率(PPB)、Shannon's 多样性指数(I)^[13]、Nei's 多样性指数(h)^[14]、种间基因多样性(H_t)、种内基因多样性(H_s)、遗传分化系数(G_{st})^[15]和基因流(N_m)^[16];并采用 UPGMA 法对 4 种红豆杉 68 个单株的遗传关系进行聚类分析。

2 结果和分析

2.1 RAPD 扩增结果分析

4 种红豆杉属植物 68 个单株的基因组 DNA 的 RAPD 扩增条带大小为 250 ~ 2 000 bp。12 条引物共获得 109 条带,其中多态性条带 108 条,平均每个引物扩增出 9.1 条带;引物 RAPD 11 扩增出的条带数最多(达 14 条),引物 RAPD 12 扩增出的条带最少(仅 5 条)。除引物 RAPD 13 外,其余 11 个引物扩增出的条带全部为多态性条带(表 1)。

表 1 用于 4 种红豆杉属植物 RAPD 分析的引物序列及扩增结果¹⁾
Table 1 Primer sequence used for RAPD analysis of four species of *Taxus* Linn. and their amplification results¹⁾

引物 Primer	5'→3'序列 5'→3' sequence	N	NPB	PPB/%
RAPD 9	GGG TAA CGC C	8	8	100.0
RAPD 10	GTG ATC GCA G	11	11	100.0
RAPD 11	CAA TCG CCG T	14	14	100.0
RAPD 12	TCG GCG ATA G	5	5	100.0
RAPD 13	CAG CAC CCA C	8	7	87.5
RAPD 15	TTC CGA ACC C	9	9	100.0
RAPD 35	GTA GAC CCG T	8	8	100.0
RAPD 66	CCG ATA TCC C	11	11	100.0
RAPD 68	CTA CGG AGG A	11	11	100.0
RAPD 73	ACC AGG TTG G	9	9	100.0
RAPD 74	TCT CAG CTG G	9	9	100.0
RAPD 77	CAG CGA CAA G	6	6	100.0
平均值 Average		9.1	9	99.1

¹⁾ N: 条带数 Number of band; NPB: 多态性条带数 Number of polymorphic band; PPB: 多态性条带百分率 Percentage of polymorphic band.

2.2 种内及种间遗传多样性分析

根据 RAPD 标记扩增结果对 4 种红豆杉属植物

种内的遗传多样性进行分析,结果见表 2。在 4 种植物中,南方红豆杉的多态性条带百分率、观察等位基因数最高,分别为 56.0% 和 1.559 6;欧洲红豆杉的有效等位基因数、Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数最高,分别为 1.384 7、0.213 5 和 0.308 6;而云南红豆杉的各项遗传参数均最低。以多态性条带百分率为指标,南方红豆杉群体的遗传多态性最高,须弥红豆杉群体的遗传多态性最低。

表 2 基于 RAPD 标记的 4 种红豆杉属植物种内遗传多样性的分析结果¹⁾

Table 2 Analysis result of intraspecies genetic diversity of four species of *Taxus* Linn. based on RAPD marker¹⁾

种类 ²⁾ Species ²⁾	PPB/%	N_a	N_e	h	I
TB	51.4	1.513 8	1.384 7	0.213 5	0.308 6
TW	43.1	1.431 2	1.264 2	0.152 1	0.225 7
TM	45.9	1.458 7	1.288 5	0.168 1	0.249 2
TWM	56.0	1.559 6	1.268 4	0.164 3	0.253 6

¹⁾ PPB: 多态性条带百分率 Percentage of polymorphic band; N_a : 观察等位基因数 Observed number of alleles; N_e : 有效等位基因数 Effective number of alleles; h : Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity; I : Shannon's 信息指数 Shannon's information index.

²⁾ TB: 欧洲红豆杉 *Taxus baccata* Linn.; TW: 须弥红豆杉 *T. wallichiana* Zucc.; TM: 曼地亚红豆杉 *T. × media* Rehd.; TWM: 南方红豆杉 *T. wallichiana* var. *mairei* (Lemée et Lév.) L. K. Fu et Nan Li.

供试 4 种红豆杉属植物种间的遗传距离和遗传相似性系数见表 3。南方红豆杉和须弥红豆杉的遗传距离最近,为 0.289 3;曼地亚红豆杉和须弥红豆杉的遗传距离最远,为 0.396 4。相反,南方红豆杉和须弥红豆杉的遗传相似性系数最大,表明这 2 种植物有较近的亲缘关系。

表 3 基于 RAPD 标记的 4 种红豆杉属植物种间的遗传相似性系数和遗传距离

Table 3 Genetic similarity coefficient and genetic distance among four species of *Taxus* Linn. based on RAPD marker

种类 ¹⁾ Species ¹⁾	不同种类间的遗传相似性系数和遗传距离 ²⁾ Genetic similarity coefficient and genetic distance among different species ²⁾			
	TB	TW	TM	TWM
TB	—	0.720 6	0.696 5	0.677 9
TW	0.327 7	—	0.672 8	0.748 8
TM	0.361 7	0.396 4	—	0.727 0
TWM	0.388 7	0.289 3	0.318 8	—

¹⁾ TB: 欧洲红豆杉 *Taxus baccata* Linn.; TW: 须弥红豆杉 *T. wallichiana* Zucc.; TM: 曼地亚红豆杉 *T. × media* Rehd.; TWM: 南方红豆杉 *T. wallichiana* var. *mairei* (Lemée et Lév.) L. K. Fu et Nan Li.

²⁾ 横线上部数据为遗传相似性系数,下部数据为遗传距离
Datums above horizontal line are genetic similarity coefficients and below genetic distances.

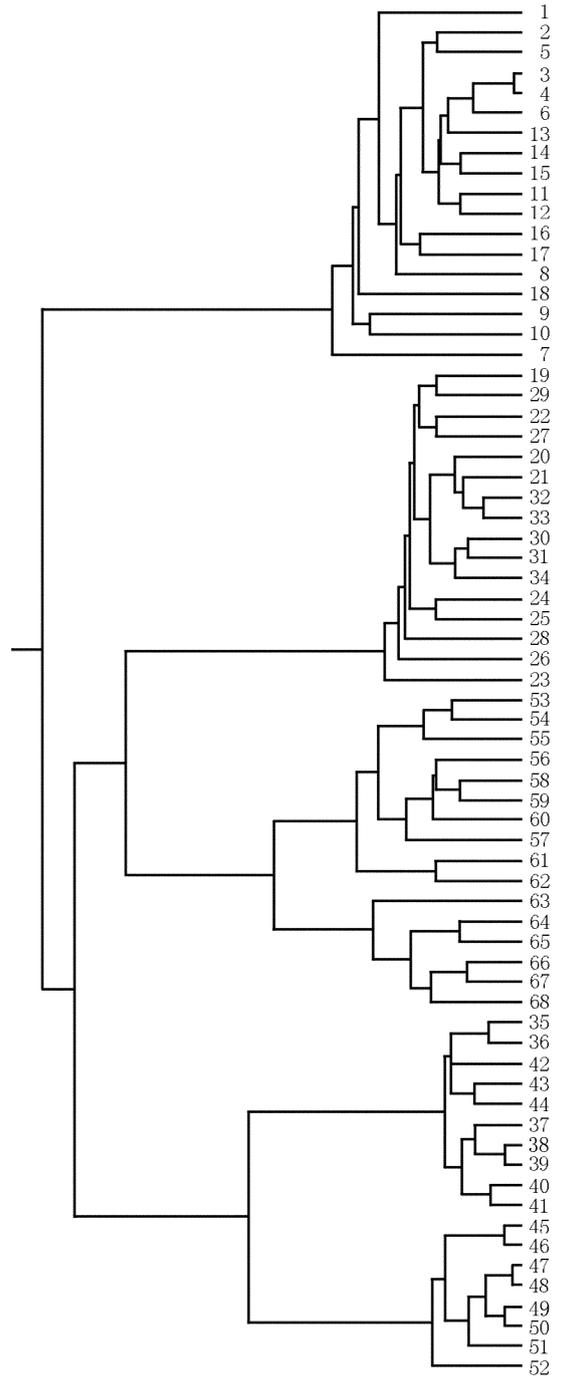
经计算,供试4种红豆杉植物的种间遗传多样性为0.3586;种内遗传多样性为0.1745,表明17.45%的遗传变异来源于种内个体间的差异;种间遗传分化系数为0.5545,表明55.45%的遗传变异发生在种间,44.55%变异发生在种内,这可能源于各种类间基因的相互交流引起的种间遗传变异增加。基因流为0.4017,小于1,表明红豆杉属种间遗传差异的主导因素受遗传漂变影响明显,其中花粉和种子的传播以及扦插繁殖等方式均能实现基因流的漂变^[17]。

2.3 聚类分析

基于 RAPD 标记的分析结果,采用 UPGMA 聚类方法获得4种红豆杉属植物68个单株的聚类图(见图1)。供试的68个单株可分为3组,其中,欧洲红豆杉的18个单株聚为1组,曼地亚红豆杉的18个单株聚为1组;须弥红豆杉的16个单株和南方红豆杉的16个单株聚为1组,且又分为2个亚组:须弥红豆杉的16个单株聚为1个亚组,南方红豆杉的16个单株聚为1个亚组,而南方红豆杉的雌、雄单株也分别被聚在同一分支上。结果表明:欧洲红豆杉和其他3种植物的遗传关系最远;而须弥红豆杉和南方红豆杉的遗传关系较近。

3 讨论和结论

植物种群的遗传多样性及遗传结构是由不同因素导致的,包括生境变化、繁殖方式、自然环境下的突变、遗传漂变和基因流等^[18]。红豆杉主要通过风媒传播且无严格的生殖隔离,这一繁殖方式使得红豆杉属植物的种间基因交流较为频繁,其多态性相对丰富。由上述实验结果可见:南方红豆杉的多态性条带百分率最高,达56.0%;而须弥红豆杉的多态性条带百分率最低,为43.1%。而张宏意等^[19]的研究结果显示:广东、湖南和江西3省的12个南方红豆杉自然居群的 RAPD 标记多态性条带百分率为51%,略低于作者的实验结果。在本研究中,供试的南方红豆杉单株均来源于南京中山植物园内的小种群,这一小种群是由1954年从庐山植物园引种的5株雄株和6株雌株经过60多年的迁地保护形成的,多态性条带百分率的提高反映了这一小种群对环境的适应能力,也说明南京中山植物园作为南方红豆杉的迁地保护区是合理的。供试的欧洲红豆杉引种自英国,其多态性条带百分率为51.4%。Zarek^[7]和 Zamani 等^[9]采用



1-18: 欧洲红豆杉 *Taxus baccata* Linn.; 19-34: 须弥红豆杉 *T. wallichiana* Zucc.; 35-52: 曼地亚红豆杉 *T. × media* Rehd.; 53-68: 南方红豆杉 *T. wallichiana* var. *mairei* (Lemée et Lév.) L. K. Fu et Nan Li.

图1 基于 RAPD 标记的4种红豆杉属植物68个单株的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of sixty-eight individuals of four species of *Taxus* Linn. based on RAPD marker

RAPD 标记对分布于波兰南部和伊朗的欧洲红豆杉的遗传多样性进行了分析,结果显示欧洲红豆杉居群内的多态性位点百分率分别为 69.59% 和 64.6%,这一结果高于作者的实验结果,可能与供试的欧洲红豆杉引种规模较小及生境变化等因素有关。曼地亚红豆杉是欧洲红豆杉和东北红豆杉的杂交种,多态性很高(高达 94%)^[6],但在本研究中,曼地亚红豆杉的多态性相对较低,可能与供试的曼地亚红豆杉采用无性繁殖方式有关。

从外部形态上红豆杉属的种类较难区分,其属下种类的界定也一直存在争议。上述研究结果显示:采用 RAPD 标记技术并利用 UPGMA 法对供试的 4 种红豆杉属植物的 68 个单株进行聚类分析,每一种类的单株均聚在一起,其中欧洲红豆杉和其他 3 种植物的遗传距离最远,可能与欧洲红豆杉的地理距离较远有关。在本实验中,须弥红豆杉和南方红豆杉遗传距离较近且聚在一起;在《Flora of China》^[3]中,南方红豆杉被认为是须弥红豆杉的 1 个变种,本文的研究结果也支持这一分类处理。

由于取材的局限性,本研究中只有南方红豆杉按雌、雄株分别取样,而聚类结果显示南方红豆杉雄株和雌株分别聚在 2 个分支上,因而,可通过筛选性别特异性条带为红豆杉植株的性别鉴定提供分子证据。

参考文献:

- [1] FARJON A. World Checklist and Bibliography of Conifers[M]. London: the Royal Botanic Gardens, Kew. 1998.
- [2] FARR K. Genus-level approach to *Taxus* species[R]//NDF Workshop Case Studies. WG1-Trees: Case Study 6. Mexico, 2008: 1-21.
- [3] WU Z Y, RAVEN P H. Flora of China: Vol. 4[M]. Beijing: Science Press, 1999: 89-96.
- [4] DU X Y, ZHANG Q L, LUO Z R. Comparison of four molecular markers for genetic analysis in *Diospyros* L. (Ebenaceae)[J]. Plant Systematics and Evolution, 2009, 281: 171-181.
- [5] GODWIN I D, AITKEN E A, SMITH L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. Electrophoresis, 1997, 18: 1524-1528.
- [6] COLLINS D, MILL R R, MÖLLER M M. Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis* and *T. cuspidata* and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data[J]. American Journal of Botany, 2003, 90(2): 175-182.
- [7] ZAREK M. RAPD analysis of genetic structure in four natural populations of *Taxus baccata* from southern Poland[J]. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2009, 51(2): 67-75.
- [8] MOHAPATRA K P, SEHGAL R N, SHARMA R K, et al. Genetic analysis and conservation of endangered medicinal tree species *Taxus wallichiana* in the Himalayan region[J]. New Forests, 2009, 37: 109-121.
- [9] ZAMANI S, ABBASIAN Z, KHAKSAR G, et al. Genomic diversity among yew (*Taxus baccata*) genotypes of Iran revealed by random amplified polymorphism DNA markers[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2008, 10(6): 648-652.
- [10] 张玲玲. 南方红豆杉 DNA 指纹图谱技术研究[D]. 福州: 福建农林大学林学院, 2009.
- [11] YEH F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE version 1.31: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [CP/CD]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [12] KIMURA M, CROW J F. The number of alleles that can be maintained in a finite population[J]. Genetic, 1964, 49: 725-738.
- [13] SHAN C E, WEAVE W, BLAHUT R E. The Mathematical Theory of Communication[M]. Urbana: University of Illinois Press, 1949: 26-38.
- [14] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973, 70: 3321-3323.
- [15] WRIGHT S. Variability Within and Among Natural Population [M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.
- [16] SLATKIN M, BARTON N H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow[J]. Evolution, 1989, 43: 1349-1369.
- [17] 刘占林, 赵桂仿. 居群遗传学原理及其在珍稀濒危植物保护中的应用[J]. 生物多样性, 1999, 7(4): 340-346.
- [18] SLATKIN M. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. Science, 1987, 236: 787-792.
- [19] 张宏意, 陈月琴, 廖文波. 南方红豆杉不同居群遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(11): 1994-1997.

(责任编辑: 惠 红)