

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0059-63

水杉自然居群遗传多样性的 RAPD 研究^{*}

李春香¹, 杨 群¹, 周建平¹, 范深厚², 杨 洪³

(¹中国科学院南京地质古生物研究所, 南京 210008;

²湖北利川市水杉保护区管理站; ³ Bryant 学院科学与技术系)

摘 要: 用随机扩增多态性方法对四川、湖南、湖北交界处的 27 个水杉样本进行了基因组 DNA 多态性分析. 11 个随机引物共获得 RAPD 谱带 121 条, 多态性谱带占 53%. 聚类分析结果表明: 水杉个体间的遗传距离与这些个体的地理分布相关, 即相同产地个体间的遗传距离较小, 不同产地个体间的遗传距离较大. 与松柏目其它类群相比, 水杉居群的遗传多样性程度高于银杉 (32%), 而在所处的大类群中则处于中等水平. 初步结果表明, 尽管子遗物种水杉的自然种群的目前分布范围和个体数目非常有限, 但是它仍然保持着中度的遗传多样性水平. 可推测, 子遗植物的遗传多样性水平具有一定的变异范围.

关键词: 水杉, 随机扩增多态性 DNA (RAPD), 自然居群, 遗传多样性

分类号: Q 7 **文献标识码:** A

水杉 (*Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng) 是中国著名的杉科子遗植物, 其现生自然居群仅局限于四川、湖北、湖南三省交界处. 由于水杉独特的发现历史和命名过程以及较为完整的化石记录, 该种自建立以来一直为生物学家所注目^[1, 2]. 迄今为止, 水杉的研究多限于形态学、解剖学及生态学方法, 这些传统方法没有揭示其居群层次上的差异, 而有关水杉在 DNA 水平上的遗传变异研究尚未见报道. 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术^[3] 为居群、种乃至属间的遗传多样性研究提供了一个快捷有效的方法. 本文以水杉原产地的原生水杉为材料, 用 RAPD 分析技术, 试图了解其居群层次上的遗传多样性水平, 为更加深入地研究我国这一珍贵活化石提供数据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

水杉营养枝上的成熟新鲜叶片, 直接采自四川、湖北、湖南三省交界处 (表 1).

1.2 基因组 DNA 提取

用 CTAB 法^[4] 提取基因组 DNA, 其浓度由 Gel Doc 1000 法测定, 经硅胶乳液纯化.

^{*} 基金项目: 中国科学院“百人计划”、中国科学院南京地质古生物所开放实验室课题基金 (973104); 国家杰出青年基金 (49725204)

收稿日期: 1998-10-15 第一作者简介: 李春香, 女, 29 岁, 博士研究生

表 1 样品的特征及产地¹⁾

Tab 1 The characteristics and localities of the samples

编号	标本号	产地	环境	编号	标本号	产地	环境
1	GH01	桂花管理区	庭院	15	XHZ13 ^{**}	桂花管理区	村内
2	GH02	桂花管理区	庭院	16	XG01	兴国管理区	公路
3	GH05	桂花管理区	庭院	17	XG02	兴国管理区	庭院
4	XH01	小河管理区	公路	18	GH03	桂花管理区	公路
5	XH02	小河管理区	桥头	19	GH04	桂花管理区	公路
6	XH03	小河管理区	村内	20	SZ01	狮子坝管理区	河边
7	XH04 ^{* 2)}	小河管理区	庭院	21	SZ02	狮子坝管理区	河边
8	XHZ001 ^{* * 3)}	桂花管理区	学校	22	PM01	湖南省龙山县洛塔乡	庭院
9	XHZ01 ^{**}	小河管理区	村内	23	CQ01	重庆市石柱县	村内
10	XHZ03 ^{**}	小河管理区	村内	24	CQ02	重庆市石柱县	村内
11	XHZ04 ^{**}	小河管理区	村内	25	CQ03	重庆市石柱县	村内
12	XHZ05 ^{**}	桂花管理区	村内	26	SM01	杉木管理区	学校
13	XHZ08 ^{**}	桂花管理区	村内	27	MD01	湖北省利川市谋道镇	桥边
14	XHZ09 ^{**}	桂花管理区	公路				

- 1) 所有标本的采集时间为 1997 年 7 月，编号 1~21、26 的产地均为湖北省利川市忠路镇；
2) * 标本为栽培树，其它的标本为原生树；
3) * * 标本为来自原生树的嫁接树（采自小河水杉母树管理站；所列产地均指母树的原产地）

1.3 PCR 扩增

扩增反应在 Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 上进行. 反应体积为 10 μ L, 其成分为: 2~3 ng DNA 模板, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.25 mmol/L dNTPs, 10 $\times$ buffer, 2.7 μ mol/L 引物 (Sangon 公司), 0.25 U Taq DNA 聚合酶 (南京生达公司). 扩增程序 94 $^{\circ}$ C 2 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 0.5 min, 35 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 40 次重复. 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min.

1.4 PCR 产物的鉴定

用 ρ =1.4%琼脂糖电泳 (TBE 系统), EB 染色. 以 100 碱基对 Ladder DNA 和 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III (MBI 公司) 作为相对分子质量标准, 使用 Gel Doc (BIO RAD 公司) 图像分析仪作观察并照相.

1.5 数据处理与分析

统计扩增产物较为稳定的 11 个引物在 27 个样品中的扩增情况, 在电泳图谱上同一 RAPD 位点上有电泳带记为 1, 无电泳带的记为 0, 作 0, 1 矩阵表输入计算机. 采用 RAPDistance Package 计算遗传距离并作聚类分支图^[3].

2 实验结果

2.1 RAPD 引物筛选

随机选取 5 个样本, 对 50 个引物进行筛选, 从中选出扩增条带清晰, 重复性较好的 20 个引物, 用此 20 个引物对所有的样本进行扩增 (表 2), 最后对扩增效果较为稳定的 11 个引物所产生的条带进行统计分析.

2.2 PCR 扩增结果

11 个引物扩增获得的 DNA 片段 121 条, 每个引物产生 5~15 条, 长度在 200~2 000 碱基对之间, 其中 64 条带有多态性, 占 53% (见表 2). 图 1 显示出引物 S122 扩增结果.

表 2 RAPD 引物及其扩增情况

Tah 2 The RAPD primers and their amplification results

引物	序 列	扩增出 条带数	非多态性 条带数	多态性 条带数	$\frac{p^{(1)}}{\%}$	引物	序 列	扩增出 条带数	非多态性 条带数	多态性 条带数	$\frac{p^{(1)}}{\%}$
S7	GGTGACGCAG	12	5	7	58.3	S213	AGGACTGCCA	11	7	4	36.4
S122	GAGGATCCCT	10	5	5	50.0	S216	GGTGAACGCT	10	1	9	90.0
S123	CCTGATCACC	5	1	4	80.0	S220	GACCAATGCC	11	8	3	27.3
S125	CGAATTCCC	15	9	6	40.0	S372	TGGCCCTCAC	11	7	4	36.4
S130	GGAAGCTTGG	13	8	5	38.5	S382	TGGGCGTCAA	11	3	8	72.7
S187	TCCGATGCTG	12	3	9	75.0	总计		121	57	64	52.9

1) 多态性条带所占的比例

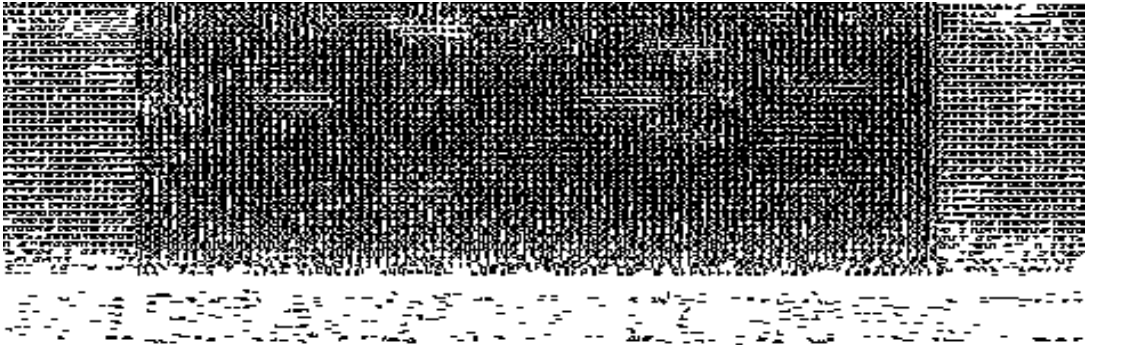


图 1 引物 S122 扩增水杉基因组 DNA 的图谱

Fig. 1 The genomic DNA pattern of *Metasequoia* amplified with primer S122
M DNA 标样 (λDNA/ *Eco*RI + *Hind*III), 1~27 水杉样品编号

3 结果分析与讨论

根据扩增结果, 采用 Neighbour-Joining 法构建样品遗传距离聚类图 (图 2), 聚类图显示, 相同分布小区内个体间的遗传距离总体上小于不同分布小区的个体间遗传距离. 因此, 影响水杉自然居群中个体间遗传距离参数的主要因素是所处地理位置的相对距离; 此外, 其它因素也可能产生一定的影响. 如样品 XHZ001~XHZ13 均为原生树的克隆个体 (已知原生树产地的嫁接树) 与同区内原生树 (XH01~XH03) 在聚类图上分属不同的相邻分支. 尽管不能排除实验过程可能造成的影响, 但从 RAPD 距离聚类分支的结果判断, RAPD 结果较好地反应了水杉自然居群 (含原生树的直接克隆个体) 内的遗传信息.

采用 RAPD 多态性条带百分比 (PPB) 来度量水杉遗传多样性水平. 根据样品的分析结果, 水杉自然居群内总 PPB 值为 52.9%, 这些水杉样品在不同分布小区内的 PPB 值变异范围以及它们与松柏目其它物种的同类结果的比较如表 3. 大体上看, PPB 值与样品的数目呈正相关; 不同分布小区之间的 PPB 值存在较大变异范围, 如兴国管理区 (10%) 和狮子坝管理区 (5%) 在样品数目相同 (均为 2 个) 的情况下, PPB 值有明显差异.

松柏目的银杉 (*Cathaya argyrophylla*)、台湾油杉 (*Keteleeria formosana*)^[6]、白云杉 (*Picea glauca*)、黑云杉 (*Picea mariana*)^[7] 的 RAPD PPB 值在 32%~85% 之间 (表 3), 其中同为濒危物

种的银杉遗传多样性水平最低(32%). 与它们相比, 水杉居群的遗传多样性(PPB 约为 52%) 在这些松柏目物种中处于中等水平, 它高于银杉、而明显低于白云杉的 PPB 值.

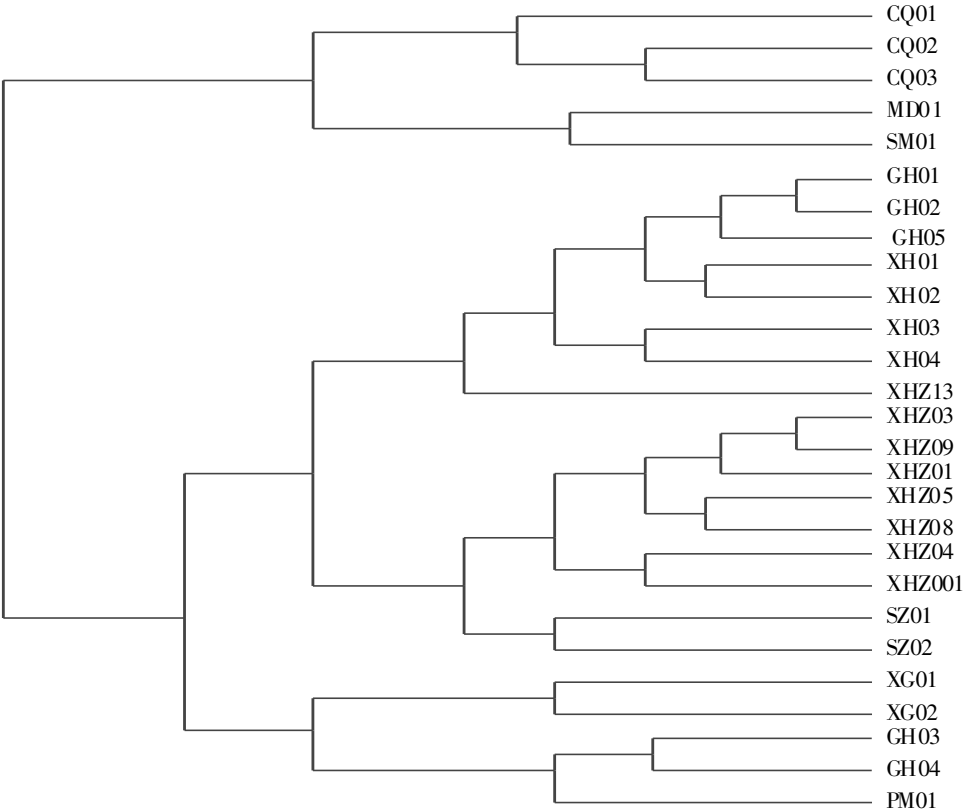


图 2 根据 RAPD 分析的数据, 用 NJ 法做出的 27 个水杉样品的聚类图

Fig. 2 NJ dendrogram for 27 *Metasequoia* samples based on RAPD data

表 3 水杉居群及松柏目其它几个物种的 PPB 值

Tah 3 A comparison of the PPB value of *M. glyptostrobaides* with those of other species in the Coniferales

物种	产地	样品个数	引物个数	扩增 条带数	多态性条带 (<i>P</i> / %)	
水杉	湖北	27	11	121	64(53)	
		23	11	121	62(51)	
		桂花管理区	10	11	121	50(41)
		小河管理区	7	11	121	42(35)
		兴国管理区	2	11	121	12(10)
		狮子坝管理区	2	11	121	6(5)
		杉木管理区	1			
		谋道镇	1			
	湖南	1				
四川	3	11	121	7(6)		
银杉		71	21	106	34(32)	
台湾油杉		71	17	273	233(85)	
白云杉		3	11	106	58(55)	
黑云杉		3	11	95	42(44)	

水杉的自然居群分布范围已从历史上的广泛地域(白垩纪和第三纪在北半球极为繁茂)

缩减为当今川湘鄂交界附近的数 10 km^2 以内. 一般认为, 濒危物种的遗传多样性水平较低, 银杉的研究结果^[6]便印证了上述观点. 然而, 水杉自然居群的遗传多样性水平大于银杉, 在松柏类植物中并不偏低. 结果说明: ① 濒危植物的遗传多样性水平具有一定的变异范围; ② 水杉较丰富的遗传多样性反映了该自然居群祖先群的遗传构成可能不是单一的; 尽管子遗物种水杉的自然种群的目前分布范围和个体数目非常有限, 但是它仍然保持着中度的遗传多样性水平. 应当指出, 上述结果有待于采取不同方法加以验证, 特别是②, 更需综合水杉的历史与地理演化资料, 实施居群动态分析, 从而进一步加以说明.

参考文献:

- [1] FULLING E H. *Metasequoia*: fossil and living. Bot Rev, 1976, 42: 215 ~ 315
- [2] HU H H, CHENG W C. On the new family Metasequoiaceae and on *Metasequoia glyptostroboides*, a living species of the genus *Metasequoia* found in Szechuan and Hupeh. Bull Fan Mem Inst Biol, New Ser, 1948, 1(2): 153 ~ 161
- [3] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531 ~ 6535
- [4] DAVID M H, BARBARA K M, ELIZABETH A Z. Molecular Systematics. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc, 1996. 1
- [5] ARMSTRONG J, GIBBS A, REAKAL R. The RAPDistance Package. Version 1.04(英特网发行)
- [6] WANG X Q, ZOU Y P, ZHANG D M. Genetic diversity analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang. Science in China(C), 1997, 40(2): 1945 ~ 1951
- [7] MOSSELER A, EGGER K, HUGHES G H. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. Can J For Res, 1992, 22: 1332

RAPD Analysis of Genetic Diversity in the Natural Population of *Metasequoia glyptostroboides*, Central China

LI Chunxiang*, YANG Qun, ZHOU Jianping, FAN Shenhao, YANG Hong

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used in analyzing population genetics of native *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng (Taxodiaceae), an endangered plant species, whose natural population today is distributed at the border area of Sichuan, Hunan and Hubei provinces in China. Leaf samples were collected from 27 nature trees in their native population and 11 arbitrary primers were used to amplify 121 bands which contain 53% polymorphic RAPD loci. The genetic distances among those 27 individuals are primarily related to their geographic distribution. By comparing the percentages of polymorphic bands (PPB) of *M. glyptostroboides* with those of 4 species in the Coniferales (32% ~ 85%), it is shown that the genetic diversity of *Metasequoia* is higher than another endangered species of *Cathaya argyrophylla* (PPB=32%), and is moderately high among those plant species. This result suggests that while an endangered species is represented by limited individuals in confined areas, the population may maintain a moderate genetic diversity. Further studies using other genetic markers will be conducted to test this hypothesis.

Keywords: *Metasequoia*, random amplified polymorphic DNA, natural population, genetic diversity

* Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Academia Sinica, Nanjing 210008, China