

# 珍稀濒危植物太行菊遗传多样性的 RAPD 分析

赵利新<sup>1</sup>, 张安世<sup>2\*</sup>, 刘莹<sup>2</sup>

(1. 河南省国有焦作林场, 河南 焦作 454191; 2. 焦作师范高等专科学校 生物系, 河南 焦作 454003)

**摘要:** 利用 RAPD 分子标记技术对太行山特有濒危物种太行菊 8 个自然居群的遗传多样性进行了研究。用 14 条引物对 8 个居群的 48 个样品进行扩增, 共得到 149 个扩增位点, 其中多态性位点 123 个, 多态性百分率 (PPL) 为 82.55%。POPGENE 分析显示, 太行菊具有较高的遗传多样性 [Nei's 基因多样性 ( $H$ ) = 0.203 3, Shannon's 多样性指数 ( $I$ ) = 0.323 0]。Nei's 遗传多样性分析表明, 8 个自然居群间出现了较高的遗传分化 (基因分化系数  $G_s$  = 0.275 2, 基因流  $N_m$  = 1.316 6)。生境的片段化和基因流障碍可能是导致太行菊居群间遗传分化显著的主要原因。

**关键词:** 太行菊; RAPD; 遗传多样性; 遗传分化; 保护策略

中图分类号: S58 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)04-0106-04

## Genetic Diversity Analysis of Rare and Endangered *Opisthopapus taihangensis* (Ling) Shih by RAPD

ZHAO Li-xin<sup>1</sup>, ZHANG An-shi<sup>2\*</sup>, LIU Ying<sup>2</sup>

(1. Henan Province Jiaozuo National Forestry Farm, Jiaozuo 454191, China;

2. Department of Biology, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454003, China)

**Abstract:** The genetic diversity of eight natural populations of *Opisthopapus taihangensis* (Ling) Shih was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). 14 primers were selected to amplify 48 individuals of eight natural populations. Among the 149 DNA loci obtained from 14 primers, 123 loci were polymorphic ( $PPL = 82.55\%$ ). The results of POPGENE analysis indicated that genetic diversity of *Opisthopapus taihangensis* (Ling) Shih was high ( $I = 0.2033$ ,  $H = 0.3230$ ). The genetic differentiation among eight populations was high ( $G_s = 0.2752$ ,  $N_m = 1.3166$ ), detected by Nei's genetic diversity analysis, and habitat fragmentation and barriers of gene flow might be the main reasons of high genetic differentiation among eight populations.

**Key words:** *Opisthopapus taihangensis* (Ling) Shih; RAPD; genetic diversity; genetic differentiation; conservation strategy

太行菊 [*Opisthopapus taihangensis* (Ling) Shih] 是一种仅分布于豫、晋、冀三省交界的太行山区的特有珍稀物种, 属多年生草本植物, 高 10~15 cm, 主要生长在海拔 1 000 m 左右的山坡上以及悬崖峭壁的石缝中, 具有清肝名目的作用<sup>[1]</sup>。由于太行菊分布范围狭窄, 生态环境独特, 繁殖能力较

弱, 加上人为采摘严重, 已处于濒危状态, 被河南省列为珍稀保护植物<sup>[2]</sup>。

RAPD 是由 Williams 等<sup>[3]</sup> 和 Welsh 等<sup>[4]</sup> 于 1990 年分别同时建立的一种采用 10 bp 随机核苷酸引物进行 PCR 扩增的分子标记技术。RAPD 分子标记技术以价格低廉、简便快捷、对 DNA 要求不

收稿日期: 2013-10-18

基金项目: 焦作市科技计划经费支持项目 (201204001)

作者简介: 赵利新 (1964-), 男, 河南沁阳人, 高级工程师, 主要从事森林生态学和种质资源学研究。E-mail: zlx138@126.com

\* 通讯作者: 张安世 (1965-), 男, 河南博爱人, 教授, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: aszhang1212@163.com

高等优点,已经广泛应用于基因指纹图谱构建、种质资源鉴定和遗传多样性分析等研究中<sup>[5-8]</sup>。本研究利用 RAPD 技术对 8 个太行菊居群的遗传多样性进行分析,旨在揭示太行菊自然居群的遗传结构和遗传多样性水平,为有效保护太行菊这一宝贵的野生资源提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料与主要试剂

2011 年 9 月在 8 个太行菊居群共采集 48 个样本(表 1)。取健康叶片于冰壶中带回实验室置于一 80 ℃ 超低温冰箱保存备用。

2×*Taq* MasterMix(含有 *Taq* DNA Polymerase, 2×*Taq* PCR Buffer, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 400 μmol/L dNTP mix)购自北京康为世纪生物科技有限公司, RAPD 引物由金唯智生物科技(北京)有限公司合成。

表 1 太行菊各居群采样点信息

代码	地点	样本数	海拔/m	地理位置
1	山西红豆杉大峡谷	6	1 054	113°26′32.0″E, 35°34′31.5″N
2	山西陵川大双村	6	1 175	113°26′21.0″E, 35°33′31.6″N
3	辉县市潭头村	6	1 110	113°26′49.4″E, 35°29′00.4″N
4	辉县市宝泉村	6	1 130	113°27′55.7″E, 35°28′44.7″N
5	辉县市西沟	6	620	113°26′07.9″E, 35°29′56.1″N
6	辉县市宝泉水库	6	850	113°29′35.4″E, 35°28′07.3″N
7	焦作市净影寺	6	840	113°10′24.0″E, 35°24′01.0″N
8	焦作市青龙峡	6	950	113°11′56.3″E, 35°23′24.4″N

1.2 RAPD 分析方法

太行菊总 DNA 提取采用改良 CTAB 法<sup>[9]</sup>。RAPD 扩增在 9700 PCR 仪上进行,在 10 μL 反应体系中,各成分用量分别为:DNA(质量浓度为 20 ng/μL) 1.2 μL,引物(浓度为 30 mmol/L) 0.7 μL, 2×*Taq* MasterMix 5.2 μL,不足部分用 RNase-free water 补齐。扩增程序:94 ℃ 3 min; 94 ℃ 1 min, 35 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 43 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶分离。

1.3 引物筛选及数据处理

选用 40 条 RAPD 引物,以 48 个太行菊样品进行 RAPD-PCR 扩增,从中选取条带清晰、多态性好的引物进行统计分析。利用 POPGENE 1.32 软件计算多态性百分率(*PPL*)、*Nei*'s 遗传一致性和遗传距离、*Nei*'s 基因多样性(*H*)、*Shannon*'s 多样性指数(*I*)、总群体基因多样性(*H<sub>t</sub>*)、基因分化系数

(*G<sub>st</sub>*)和基因流(*N<sub>m</sub>*)。采用 NTSYSpc 2.10e 软件依据各居群 *Nei*'s 遗传一致性构建居群间 UPGMA 聚类图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 引物筛选及扩增结果

利用 40 条 RAPD 引物对 48 个太行菊样品进行 PCR 扩增,从中筛选出了 14 个条带清晰、多态性好的引物,序列见表 2。14 条引物共扩增出 149 个条带,每条引物扩增出 7~14 个条带,平均每条引物扩增出 10.6 个条带。在物种水平上共有 123 个多态性条带,多态性百分率为 82.55%。在居群水平上,多态性百分率在 35.57%~46.98%,平均为 42.54%(表 3),其中辉县市西沟居群和焦作市净影寺居群的多态性百分率最高(46.98%),山西红豆杉大峡谷居群的多态性百分率最低(35.57%)。

表 2 RAPD 引物编号与序列

引物编号	引物序列(5'→3')
A1	CAGGCCCTTC
A2	TGCCGAGCTG
A4	AATCGGGCTG
A5	AGGGGTCTTG
A8	GTGACGTAGG
A10	GTGATCGCAG
A11	CAATCGCCGT
A13	CAGCACCCAC
A18	AGGTGACCGT
A20	GTTGCGATCC
B12	CCTTGACGCA
B15	GGAGGGTGTT
B17	AGGGAACGAG
B18	CCACAGCAGT

表 3 太行菊 8 个居群的遗传多样性参数

代码	多态条带数	多态性百分率/%	<i>Nei</i> 's 基因多样性	<i>Shannon</i> 's 多样性指数
1	53	35.57	0.127 1	0.190 0
2	67	44.97	0.171 0	0.251 9
3	65	43.62	0.152 3	0.227 9
4	57	38.26	0.128 5	0.194 4
5	70	46.98	0.159 1	0.240 5
6	66	44.30	0.149 2	0.225 8
7	70	46.98	0.162 9	0.244 8
8	59	39.60	0.128 5	0.195 6
平均	63.38	42.54	0.147 3	0.221 4
物种水平	123	82.55	0.203 3	0.323 0

## 2.2 太行菊各居群的遗传多样性

如表 3 所示,各居群的 Nei's 基因多样性( $H$ )在 0.127 1~0.171 0,平均 Nei's 基因多样性  $H=0.147 3$ 。各居群的 Shannon's 多样性指数( $I$ )在 0.190 0~0.251 9,平均为 0.221 4。在物种水平上,Nei's 基因多样性  $H=0.203 3$ ,Shannon's 多样性指数  $I=0.323 0$ 。从各居群的 Nei's 基因多样性和 Shannon's 多样性指数可以看出,山西陵川县大双村和焦作市净影寺的太行菊居群具有较高的遗传变异,山西红豆杉大峡谷的太行菊居群遗传分化程度较低。

## 2.3 太行菊居群间的遗传分化

依据 POPGENE 分析结果,太行菊总的居群基因多样性( $H_t$ )为 0.203 3,群体内基因多样性( $H$ )为 0.147 3。居群间基因分化系数( $G_s$ )为 0.275 2,表明:在太行菊的 8 个自然居群中,总遗传多样性有 27.52%来自居群间遗传变异,72.48%来自于居群内的遗传变异,居群内的遗传分化大于居群间的遗传分化。基因流  $N_m=1.316 6$ ,说明太行菊各居群间存在着低水平的基因交流,各居群间出现了一定程度的遗传分化。

## 2.4 太行菊居群间聚类分析

利用 POPGENE 计算居群间遗传距离与遗传一致性,结果显示,各居群的遗传距离在 0.052 0~0.111 5,平均为 0.077 9,遗传一致性在 0.894 5~0.949 3,平均为 0.925 1。其中山西红豆杉大峡谷和山西陵川大双村两居群间遗传距离最小(0.052 0),而辉县市潭头村和焦作市青龙峡居群间遗传距离最大(0.111 5)。

利用 NTSYS 软件,依据 Nei's 遗传一致性进行 UPGMA 聚类分析(图 1)。当相似系数取 0.927 时,这 8 个太行菊居群可分为三大组,其中山西红豆杉大峡谷(1)、山西陵川县大双村(2)、辉县市潭头村(3)和辉县市宝泉村(4)聚为一组,辉县市西沟(5)和辉县市宝泉水库(6)聚为一组,焦作市净影寺(7)和焦作市青龙峡(8)聚为一组。各居群间的遗传关系与地理距离基本一致。

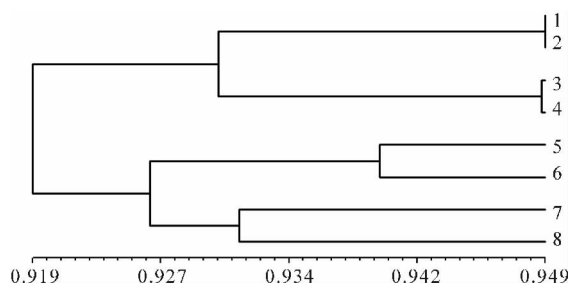


图 1 太行菊居群间 Nei's 遗传一致性的 UPGMA 聚类结果

## 3 讨论

### 3.1 太行菊的遗传多样性

本研究通过 RAPD 标记对太行菊 8 个居群的分析表明:8 个居群在物种水平上的多态性百分率( $PPL$ )为 82.55%,Nei's 基因多样性( $H$ )为 0.203 3,Shannon's 多样性指数( $I$ )为 0.323 0。3 项指标均显示太行菊居群在物种水平上具有较高的遗传多样性。目前,针对特有种和濒危物种遗传多样性的研究主要有 2 种观点。有些研究表明,特有种和狭窄分布种的遗传多样性较低<sup>[10-11]</sup>,而也有不少研究发现,有些特有种和濒危物种保持较高的变异水平<sup>[12-14]</sup>,本研究结果与此结论一致。因此推测,太行菊原本就拥有丰富的遗传基础,以后随着生境的破坏,造成大量个体灭绝,幸存的个体将其祖先丰富的遗传多样性保存了下来<sup>[15]</sup>。

### 3.2 太行菊的遗传分化

群体遗传变异的产生主要靠基因流和突变 2 种方式<sup>[16]</sup>,其中基因流对群体遗传分化具有重要影响<sup>[17]</sup>。基因流增加了群体内部的遗传变化,高水平的基因流可以防止种群的分化,而低水平的基因流可能造成种群对局部生态环境的适应,进而促使种群间的遗传隔离<sup>[18]</sup>。8 个太行菊居群的基因分化系数( $G_s$ )为 0.275 2,表明太行菊不同居群间出现了一定的遗传分化,各群体间的基因流也处于较低水平( $N_m=1.316 6$ )。太行菊独特的生境可能对各群体间的基因交流产生一定的隔离作用,从而导致太行菊不同居群间出现一定程度的遗传分化。

### 3.3 太行菊的聚类分析

聚类结果基本反映了各居群间的地理位置关系。如第 1 组山西的 2 个居群(1 和 2)距离最近,首先聚在一起,第 3 组焦作市的 2 个居群(7 和 8)也聚在了一起。但距离较近的辉县市的 4 个居群(3、4、5 和 6)并未完全聚在一起,潭头村(3)和宝泉村(4)2 个居群与距离较远的山西 2 个居群(1 和 2)聚为一组,辉县市的另外 2 个居群(5 和 6)单独聚为一组。究其原因,可能是因为这些居群间的生态环境极为相似<sup>[19]</sup>,也可能这些距离较远的居群存在着遗传交换<sup>[18]</sup>。

### 3.4 太行菊濒危机制的探讨

稀有或濒危植物的致濒机制研究是保护生物学中的核心问题之一<sup>[20]</sup>。针对一些稀有或濒危物种遗传多样性较高的特征,相关的研究指出致濒的直接原因是生境的片断化、环境的变迁和人为干扰等生态因素<sup>[21]</sup>,同时与其本身的生殖障碍也有关

系<sup>[22]</sup>。太行菊主要生长在山坡及悬崖峭壁的石缝中<sup>[1]</sup>,生境险峻,分布狭窄,由此导致各群体间的基因交流产生一定的隔离。同时,人为的挖掘采摘现象日益严重,生境遭到破坏,再加上太行菊本身繁殖能力较弱,最终导致太行菊群体范围逐步缩小,加剧其濒危进程。

因此,保护太行菊的野生资源已迫在眉睫。保护遗传多样性的重要手段之一是保护其生境,具体应以就地保护为主,迁地保护为辅,加强太行菊保护生物学的研究,为制定详尽的太行菊保护策略提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 丁宝章,王遂义. 河南植物志(第三册)[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1998:632.
- [2] 何敏杰,程月琴,王红卫,等. 太行菊 DNA 提取和 ISSR 标记的筛选与优化[J]. 中国农学通报,2012,28(16): 202-207.
- [3] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [4] Welsh J, Mc Clelland M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [5] 刘韬,车建美,黄素芳,等. 福建省主要杨桃品种遗传多样性分析[J]. 果树学报,2011,28(3):448-452.
- [6] 李健,范文洁,陈昕,等. 不同地理种源雷公藤的 RAPD 分析[J]. 四川农业大学学报,2011,29(3):327-333.
- [7] 陈曦,汤庚国,郑玉红,等. 苹果属山荆子遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 西北植物学报,2008,28(10): 1954-1959.
- [8] 乔燕春,林顺权,何小龙,等. 普通枇杷种内和种间杂种苗的 RAPD 鉴定[J]. 果树学报,2010,27(3):385-390.
- [9] 张安世,邢智峰,刘永英,等. 苔藓植物 DNA 不同提取方法的比较分析[J]. 河南科学,2009,27(5):559-562.
- [10] 金则新,李钧敏. 七子花种群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 林业科学,2004,40(4):68-74.
- [11] 谢国文,彭晓瑜,郑燕玲,等. 濒危植物永瓣藤遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 林业科学,2007,43(8):48-53.
- [12] 彭艳秋,邵剑文,张小平,等. 珍稀濒危植物安徽羽叶报春遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 云南植物研究, 2007,29(5):549-553.
- [13] 李建辉,金则新,李钧敏. 濒危植物长叶榧群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 应用生态学报,2007,18(12): 2661-2667.
- [14] 陈俊秋,慈秀芹,李巧明,等. 樟科濒危植物思茅木姜子遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性,2006, 14(5):410-420.
- [15] 金则新,李钧敏. 珍稀濒危植物夏蜡梅遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 应用生态学报,2007,18(2):247-253.
- [16] 曲若竹,侯林,吕红丽,等. 群体遗传结构中的基因流[J]. 遗传,2004,26(3):377-382.
- [17] 由永飞,邓洪平. 珍稀濒危植物金毛狗的 SRAP 分析[J]. 西北植物学报,2012,32(4):688-692.
- [18] 侯大斌,任正隆,舒光明. 附子野生资源群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生态学报,2006,26(6):1833-1841.
- [19] 陈曦,汤庚国,郑玉红,等. 苹果属山荆子遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 西北植物学报,2008,28(10): 1954-1959.
- [20] 黄久香,庄雪影. 观光木种群遗传多样性研究[J]. 植物生态学报,2002,26(4):413-419.
- [21] 葛颂,洪德元. 濒危物种裂叶沙参及其近缘广布种泡沙参的遗传多样性研究[J]. 遗传学报,1999,26(4): 410-417.
- [22] 罗光佐,施季森,尹佟明,等. 利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸与鹅掌楸种间遗传多样性[J]. 植物资源与环境学报,2000,9(2):9-13.