

不同地理种群羊草分子水平上生态型分化的研究

钱 吉, 马玉虹, 任文伟, 郑师章

(复旦大学环境与资源生物系生物多样性研究所, 上海 200433)

摘要: 将来自内蒙古不同地区及吉林盐碱地的羊草 (*Leymus chinensis*) 种子同时栽培于校园, 以 5 个样点 (阿旗、定位站、西乌旗、谢尔塔拉、吉林) 的羊草幼叶为材料, 选用 20 个随机短引物 (10nt) 进行了 DNA 随机扩增, 共计获得 100 个多态性片段。所得 RAPD 数据利用自编的计算机软件进行聚类分析、构建分子进化树, 结果表明: 定位站和西乌旗遗传距离最近, 应为同一生态型; 而吉林和谢尔塔拉分属不同生态型; 阿旗较特殊与其它 4 个地理种群有很大区别, 也应单独作为一种生态型。此结果与对羊草的水分胁迫下游离脯氨酸含量变化的聚类图较相近, 从而进一步证实水分是影响羊草种群间遗传变异和生态型分化的一个最主要的因子。

关键词: 羊草; 不同地理种群; 生态型分化; RAPD

Comparative study on ecotype differentiation of *Leymus chinensis* in different geographic populations at molecular level

QIAN Ji, MA Yu-Hong, REN Wen-Wei, ZHENG Shi-Zhang (Department of Environment and Resource Biology, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The *Leymus chinensis* from different geographic populations were cultured in the campus and were used as materials in this research. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was applied to these populations. Twenty random 10-mer primers yielded one hundred RAPD polymorphic bands. Bands were scored (+/-) and un-weighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) was used to generate dendrograms showing genetic relationships among the evaluated *L. chinensis* populations. Cluster analysis showed that Xiwuqi and Dingweizhan's populations have the smallest genetic distance and belong to the same ecotype; Xeltala and Jilin's may belong to the different ecotypes; Aqi's may be thought as other ecotype, because it has special characteristics. The result also made us sure that water was the most important factor among all that influence the ecotype differentiation among different geographic populations of *Leymus chinensis*.

Key words: *Leymus chinensis*; different geographic populations; ecotype differentiation; RAPD

文章编号: 1000-0933(2000)03-0440-07 中图分类号: Q145, Q948 文献标识码: A

羊草 (*Leymus chinensis*), 一种多年生根茎禾草, 为广幅旱生草原建群种和盐生草甸的优势种, 广泛分布于我国东北、内蒙古和新疆等地 (东西横跨东经 92°至 132°, 南北跨于 36°至 62°之间), 在这样大的跨度内, 水分、温度及土壤等生态因子都有着明显的差别, 从而为羊草形成不同生态型提供了极大的可能性。我国的很多学者已从各个方面对它做过大量的研究^[1~3], 并认为水因子是众多生态因子中影响羊草生长发育的一个关键因子和限制因子。而近年来对不同地理种群羊草在个体、生理、细胞、分子等不同水平上的变异和分化也作了大量研究, 发现各种群的羊草在形态结构、PEG 胁迫下电阻电导和游离脯氨酸含量的变

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目“植物种群生态适应机理研究”(39330050)

收稿日期: 1998-07-15 修訂日期: 1998-11-27

作者简介: 钱 吉 (1969~), 讲师

化、同工酶变异等层次所得研究结果不尽相同^[4,5],表现在对其变异的选择不仅受到水分的影响,而且还受到诸如温度、土壤等多因子的作用,是各因子综合作用的结果。从而也反映了羊草种群遗传分化的复杂性,即在不同的层次上表现出了不同的适应性反应。RAPD(Random amplified polymorphic DNA)是近年来兴起的第二代分子标记技术,已广泛应用于系统学、品种资源鉴定等各方面的研究^[6,7]。本文以不同地理种群羊草为材料进行 RAPD 研究,以期通过对基因组 DNA 多态性分析,进一步探讨羊草种群的变异和分化与各生态因子的关系,并确定影响其分化的主导因子,为羊草生态型的划分直接提供 DNA 大分子水平的依据。这对于今后进一步采用各种分子生物学技术探讨和解决一些经典的生态学问题如生物的适应机制、种群的遗传分化等,推动分子生态学的发展,也是有益的尝试。

1 材料与方法

1.1 实验材料

羊草种子的采集参见文献 4 和 5(种子按样点收集各约 30 株)。将收集到的羊草种子放在温室内 25℃ 下进行萌发,然后将幼苗移栽到温室花盆里进行盆栽;同时将同一类型的羊草种子播洒在田间萌发、生长。样点分别为:阿旗(阿巴嘎旗)、定位站(中国科学院草原定位点)、西乌旗(西乌珠穆沁旗)、谢尔塔拉(海拉尔市谢尔塔拉风景区)和吉林(吉林省长岭县腰井子羊草草原自然保护区)。(以下均用简称)这 5 个样点的主要生境资料见表 1。

表 1 几个主要考察地点的生境资料
Table 1 The data of environment in the main investigated plot

样点 Sample	纬度(°N) Latitude	经度(°E) Longitude	海拔(m) Altitude	≥10 度的积温 (°C)Total temperature	年降水(ml) Annual percipitation	湿润系数 Moisture coefficient	土壤类型 Soil type
阿旗 ^①	N44.0	E115.0	1100~1300	2000	200~250	0.13	栗钙土 ^⑥
定位站 ^②	N43.6	E116.7	1000~1300	2200	350	0.3	典型栗钙土 ^⑦
西乌旗 ^③	N44.6	E117.6	1000~1300	2000	300~350	0.3	暗栗钙土 ^⑧
谢尔塔拉 ^④	N50.5	E120.2	700~800	1700	350~400	0.6~0.9	黑钙土 ^⑨
吉林 ^⑤	N44.6	E122	500	2545~3374	313~581	0.8	盐碱地 ^⑩

阿旗的种子采自牧民的围栏内 The seed of Aqi was from ranch ①Aqi;②Dinweizhan;③Xiwuqi;④Xieertala;⑤Jilin;⑥Chestnut soil;⑦Typical chestnut soil;⑧Dark chestnut soil;⑨Chemozem;⑩Saline-alkali soil

1.2 实验方法

DNA 的提取采用改进的 CTAB 法^[8],从羊草的新鲜嫩叶片中提取总 DNA(DNA 的提取用的是混合样品)。所用随机引物由中国科学院生工基地合成,共 20 个引物为经初步筛选的 10 个碱基的寡聚核苷酸(P1~P20)组成(引物序列略)。

PCR 扩增的总体积为 25μl,在 Hybaid 热循环仪(U. K.)上进行,反应条件为:95℃变性 0.5min,而后 94℃变性 1min,35℃退火 1min,72℃延伸 1.5min,共进行 40 个循环;最后 72℃延伸 5min。

1.3 结果处理

扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,透视式紫外灯下观察,拍照记录。
以标准分子量标记(λDNA/EcoR I + Hind III,及 PBR322/Hae III)为对照,由此确定扩增片断的分子量大小。随机扩增片断以+(有)或-(无)表示,所得数据输入计算机进行统计分析,计算种群间的相似系数(Similarity,S)和遗传距离(Genetic Distance,D)并进行 UPGMA 聚类分析。所用公式如下: $S_{XY} = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$, N_{XY} 代表种群 X 与种群 Y 共有的条带数, N_X 、 N_Y 分别代表种群 X、种群 Y 各自具有的条带数。 $D_{XY} = -\ln S_{XY}$, D_{XY} 代表种群 X 与种群 Y 间的遗传距离。当 $S=0$ 时,两者差异最大;当 $S=1$ 时,两者相似性最大。

2 结果与分析

2.1 经初步筛选的 20 个随机短引物(10nt)在 5 个不同地理种群中共扩增到 139 条 DNA 片断,片断分子量多集中在 300~1500 之间(见图 1),其中多态性片断为 100 条,平均每个引物 5 条。

2.2 不同地理种群羊草由 20 个引物 RAPD 分析所获得的相似系数及遗传距离数据结果列于表 2。

表 2 不同地理种群羊草 RAPD 分析所得的相似系数(对角线下方)及遗传距离(对角线上方)

Table 2 The similarity (under diagonal) and genetic distance (upon diagonal) among different geographic populations of *Leymus chinensis* according RAPD data

	jil	xel	xwq	dwz	aq
jil	—	0.419	0.357	0.465	0.565
xel	0.657	—	0.320	0.252	0.610
xwq	0.700	0.720	—	0.154	0.340
dwz	0.620	0.777	0.857	—	0.411
aq	0.568	0.543	0.706	0.660	—

(jil: 吉林; xel: 谢尔塔拉; xwq: 西乌旗; dwz: 定位站; aq: 阿旗)

2.3 通过对 5 个不同地理种群羊草的遗传距离数据进行 UPGMA 聚类分析,得到聚类图(图 2)。其中西乌旗与定位站之间遗传距离最小为 0.154,故率先聚成一类,再与谢尔塔拉聚集(遗传距离为 0.290),而后与吉林归并(遗传距离为 0.415),最后再与阿旗聚成一大类(遗传距离为 0.530)。

3 讨论

Turesson 于 1922 年首次提出生态型概念,认为它应包括 3 方面的内容:①绝大多数广布种在形态学和生理学的特性上表现出地理空间的差异;②这些植物种内变异都与特定的生境条件相联系;③生态学上的变异不仅是由于对环境的可塑反应,更重要的是通过自然选择,具有遗传基础。可见遗传变异是生态型形成的基础,而环境因子的选择是生态型分化的条件。所以生态型是对某一特定的生境发生基因型反应的产物。随后很多学者对各物种的生态型进行了研究;对于羊草也已有人做过划分,如有的学者将羊草划分成岭、海拉尔、嘎达苏、伊胡塔四种类型或被归并为早熟、中熟、晚熟 3 种气候生态型,也有的学者按光合速率和土壤把其划分成旱生、中旱生和盐中生 3 种生态类型等^[9,10]。但很多工作是定点研究,所研究的种群地理范围相对较为集中。

以往对生态型的划分主要根据表型差异进行的,随着 RAPD 等分子生物学方法的引入,能够直接在 DNA 的水平检测和反映种群间的遗传变异,使得生态型的划分突破了表型的限制,即由基因组水平上检测出的与环境相关的种群间差异构成不同生态型。

将来自内蒙古高原各草原类型和吉林盐碱地的羊草在个体、生理、细胞、同工酶等水平作了系统研究,发现其遗传分化是比较复杂的。为此本研究进一步采用 RAPD 方法检测各地理种群羊草分子水平上的差

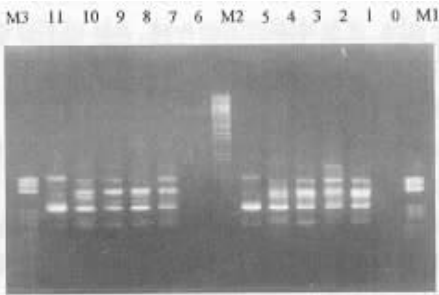


图 1 不同地理种群羊草引物 P19(右)和 P20(左) RAPD 电泳结果

(M1、M2、M3 分别为分子量标记;PBR322/Hae III、λDNA/EcoR I + Hind III、PBR322/Hae III;0~11:分别为空白对照;吉林;谢尔塔拉;西乌旗;定位站;阿旗;空白对照;吉林;谢尔塔拉;西乌旗;定位站;阿旗)
Fig. 1 The RAPD electrophoretogram of primer P19 (right) and P20(left) in different populations of *Leymus chinensis* (λ+PBR32),
M1;PBR322;0. empty 1. Jilin 2. Xetl 3. Xwq 4. Dwz 5. AQ. M2;λDNA/EcoR I +Hind III ;6. empty 7. Jilin 8. Xetl 9. Xwq 10. Dwz 11. Aq M3;PBR322

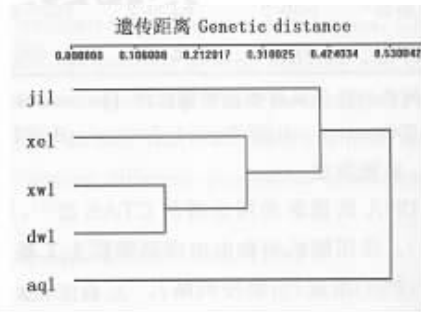


图 2 不同地理种群羊草 RAPD 聚类分析图 (jil: 吉林; xel: 谢尔塔拉; xwl: 西乌旗; dwl: 定位站; aql: 阿旗)

Fig. 2 The agglomerate classification of different geographic populations of *Leymus chinensis* according to RAPD data

异,帮助划分生态型,并确定影响生态型分化的主导因子。从 RAPD 分析结果来看,羊草种群的多态位点比率为 71.9%(多态位点比例=多态位点数/所测总位点数),与野生大豆(36%~50.7%)相比较^[11]。这可能与羊草为风媒、异花授粉有关,而野生大豆是自交群体。

从聚类结果来看,定位站与西乌旗的羊草种群相似系数最大,遗传距离最近,反映了相邻产地之间遗传差异相对较小,这可能是由于两者地理位置上较靠近,年降水量、土壤湿润系数等较一致,故难以划分开;而谢尔塔拉、吉林与之相互间都能区分开;阿旗的羊草较为特殊,与其它种群之间遗传距离最远,由于种子采自牧民围栏内,可能为经改良驯化过的栽培品种。

进一步联系已做过的工作,发现其聚类图与用 PEG 模拟水分胁迫情况下羊草叶片游离脯氨酸含量变化及叶片水分含量变化的聚类分析图相对比较接近,因此 RAPD 结果在分子水平上证实了水分在影响羊草种群分化的众多生态因子中起着主导因子的作用。同时也进一步确信我们综合羊草各层次研究结果得出的结论是合理的,即随着水因子在内蒙古高原上连续的梯度变化,羊草各种群间也呈连续的倾群变异,故西乌旗和定位站羊草的生态型较难划分开;由于谢尔塔拉样点羊草的种子采自“绿海明珠”风景点的湖中小岛上,水分比较充沛,因此在这里发生突变,可单独划分为一个生态型,这从其各水平上的性状都显得特殊也可得到反映;而吉林的羊草其原生境为盐碱地,且在各个层次上也都明显区别于内蒙古各样点的羊草,因而可认为是不同的土壤生态型;阿旗的羊草种群按理应较抗旱,实验证明其各方面表现特别,可能不是野生种群,而是经过栽培驯化的良种,这在 RAPD 聚类图上也能得到反映。

另外 RAPD 聚类分析的结果,与各地理种群羊草叶形变化的情况也较相似,表明羊草同地栽培保持的叶形变异也是有着其 DNA 分子基础的。

由于种子是按样点采集的,DNA 提取采用的是混合样品,故本研究集中讨论的是各地理种群间的遗传变异,种群内的变异正将作进一步研究。

参考文献

- [1] 刘书润,刘钟龄. 内蒙古锡林河流域植物区纲要. 草原生态系统研究,1988,3:261.
- [2] 白永飞,等. 羊草草原群落生物量季节动态研究. 中国草地,1994,3:1~5.
- [3] 赵喜印,等. 气象因素对羊草草场生产力的影响. 中国草地,1993,6:26~29.
- [4] 任文伟,钱 吉,郑师章. 不同水分处理情况下不同样点一年生羊草性状的比较研究. 应用生态学报,1997,8(2):157~160.
- [5] 任文伟,钱 吉,马 骏,等. 不同地理种群羊草在聚乙二醇胁迫下含水量及游离脯氨酸含量的比较. 生态学报,2000,20(2):349~352.
- [6] 惠东威,庄炳昌,顾 京,等. 利用 RAPD 对大豆属植物系统学研究的初报. 科学通报,1994,39(2):175~178.
- [7] Ratnaparkhe MB, Gupta VS, Ven Murthy MR, et al. Genetic fingerprinting of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and its wild relatives using RAPD markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91(6~7):893~898.
- [8] Keim P, Shoemaker RC. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet Newsl*, 1988, 15(1):150~152.
- [9] 王克平,罗 璇. 羊草物种分化的研究 V. 羊草种内分化的四个生态型. 中国草地,1988,(2):51~52.
- [10] 陆静梅,李建东,胡阿林,等. 羊草种群生态和演化形态学特性的比较研究. 应用生态学报,1996,7(1):44~48.
- [11] 王洪新,胡志昂,钟 敏,等. 盐渍条件下野生大豆群体的遗传分化和生理适应:同工酶和随机扩增多态 DNA 研究. 植物学报,1997,39(1):34~42.