

羊草种群遗传分化的 RAPD 分析 II. RAPD 数据的统计分析

崔继哲^{1,2}, 祖元刚¹, 聂江城¹

(1. 东北林业大学森林植物生态学重点实验室, 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨 150080)

摘要:对松嫩草原上分布的灰绿型和黄绿型羊草 9 个种群进行了 15 个引物的 RAPD 分析。统计结果表明, 两类种群的扩增片段数和多态位点比率明显不同, 黄绿型种群低于灰绿型, 其值分别 <90 与 >100 , $<50\%$ 与 $>70\%$ 。比较了 7 种不同统计方法据 RAPD 表型或基因型频率估算的种群遗传多样性, 几种统计结果都揭示, 黄绿型种群低于灰绿型种群。用 F_{IS} 值矫正种群对 Hardy-Weinberg 平衡的偏离后, 估算等位基因频率, 通过 Shannon 指数和 Nei 指数估计羊草种群间分化分别为 37.6% 和 35.7%, 高于等位酶的分析。讨论比较了等位酶和 RAPD 分析结果的异同。

关键词:羊草; RAPD; 遗传多样性; 遗传分化

Genetic Differentiation in *Leymus chinensis* Populations Revealed by RAPD Markers II. Statistics Analysis

CUI Ji-Zhe^{1,2}, ZU Yuan-Gang¹, NIE Jiang-Cheng¹ (1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin 150080, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(7): 982~989.

Abstract: *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel., which is one of rhizome grass species, has two ecotypes in the Songnen Plain, including a gray green type and a yellow green type. The levels of genetic diversity and genetic differentiation based on RAPDs were assessed among seven populations of the gray green type and two populations of the yellow green type (a total of 105 individuals). Fifteen 10-mer primers screened from seventy Operon's primer series were used to amplify RAPD fragments using a standard RAPD protocol. The number of amplified fragments and the percentage of polymorphic loci were different among nine populations. Populations that belong to the yellow green type possessed fewer amplified fragments (<90) and lower percentage of polymorphic loci ($<50\%$) than that of the gray green type (>100 and $>70\%$ respectively). Genetic diversity based on RAPD phenotypic or genotypic frequencies was calculated using seven published methods by the statistical package RAPDISTANCE. The genetic diversity level in the yellow green type was lower than that in the gray green type. F_{IS} value previously estimated with codominant markers, e. g. allozymes for the same population was used to estimate the null-allele frequencies for putative RAPD loci corrected for potential deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. Shannon's information index and Nei's index of genetic differentiation were used to partition diversity within and among population components, and 37.6% or 35.7% of the variation detected with RAPDs was partitioned among populations. Genetic identity between the populations of two types were both on 0.8, while the genetic identity within the gray green populations was above 0.9. The results achieved by the methods of either allozymes previously adopted or RAPDs revealed the same genetic pattern of variation. These results at the DNA level were parallel to those at the protein level. At both the protein

基金项目:国家教委跨世纪优秀人才计划基金项目

收稿日期:2000-11-25; **修订日期:**2001-19-15

作者简介:崔继哲(1962~), 女, 黑龙江人, 博士, 教授。主要从事植物分子生物学研究。

and DNA levels, genetic polymorphism was higher in the populations of the gray green type than that in the yellow green populations.

Key words: *Leymus chinensis*; RAPD; genetic diversity; genetic differentiation

文章编号:1000-0933(2002)07-0982-08 中图分类号:Q145,Q948 文献标识码:A

RAPD 技术自问世以来,已广泛用于植物分子生态学研究领域^[1~5]。但是,由于几乎所有的 RAPD 标记都是显性的,因而利用 RAPD 资料进行遗传变异的统计分析,还没有一个统一公认的方法。羊草是根茎型禾本科植物,分布广泛。在不同的土壤、水分、温度等生态因子作用下,在长期的适应和进化过程中,羊草种群产生了不同程度的分化。有报道,不同地理种群的羊草遗传分化具有复杂性,在不同的层次上表现出不同的适应性反应^[6,7]。在“羊草种群生态型分化的分子生态学”系统研究中,通过移栽试验、等位酶分析和 RAPD 技术,分析了松嫩草原上黄绿型和灰绿型两种叶色类型羊草种群的遗传变异性及其分化,发现这两类羊草的分化在这 3 个层次上是一致的。在 RAPD 分析中,对 RAPD 数据进行了多种方法的统计分析,以期使研究结论更可靠,同时探讨了这些分析方法的适用性。本文报道有关 RAPD 统计分析研究的结果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从栽植于实验园地内的 9 个羊草种群 CHLG1、CHLG5、CHLG6、CHLG7、CHLG8、CHLY8、CHLY9、WLMGG 和 WLMYG 中,各随机选取 15 个样株,剪取新萌生的嫩叶,置 4℃ 备用。其中 CHLXX 采自吉林省长岭腰井子草原,CHLY8 和 CHLY9 为黄绿型,其它 5 个种群为灰绿型;WLMXX 采自黑龙江省肇东五里木草场,叶色为灰绿型^[8]。野外采样方式及生境条件详见前文^[8~10]。

1.2 实验方法

采用 CTAB 法,按文献^[11]提取 DNA。对 70 个 Operon 系列引物进行筛选,选出 15 个用于各种群样本的扩增,扩增反应在 PE9600 型 PCR 仪上进行。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外透射仪上观察拍照,记录结果。试验条件及扩增产物的检测、记录详见文献^[10]。

1.3 数据分析

1.3.1 多态位点比率 P 扩增的 DNA 片段出现频率小于 0.99 的位点为多态位点:

多态位点比率 $P = \text{具有多态的位点数} / \text{检测到的位点数}$

1.3.2 基于相似系数,由遗传距离指标估算遗传多样性——根据 RAPD 标记计算两个个体间的相似系数 F ,求出两个个体间遗传距离 D 。以种群内个体间遗传距离的平均值作为该种群遗传多样性的估测值^[3]。

本研究分别用下列 5 种方法^[3]计算相似系数 F :

- | | |
|----------------|--|
| (1) Nei & Li 法 | $n_{11} / (2n_{11} + n_{01} + n_{10})$ |
| (2) Jaccard 法 | $n_{11} / (n - n_{00})$ |
| (3) Russell 法 | n_{11} / n |
| (4) Apostol 法 | $(n_{11} + n_{00}) / n$ |
| (5) Rodgers 法 | $(n_{11} + n_{00}) / (n_{11} + 2(n_{10} + n_{01}) + n_{00})$ |

其中, n = 谱带位数; n_{11} = 两个个体都有带的位数(即 $x=1$ 和 $y=1$ 的位数); n_{00} = 两个个体都无带的位数(即 $x=0$, 且 $y=0$ 的位数); n_{01} = x 无带, y 有带的位数; n_{10} = x 有带, y 无带的位数, x 和 y 为相比较的两个个体。

用 RAPDISTANCE^[12] 软件计算各相似系数,并同时转换成相应的遗传距离。对(1)式,按 $D=1-F$ 和 $D=\sqrt{1-F}$ 分别计算,其它几式,都按 $D=1-F$ 计算。

1.3.3 Shannon 信息指数 Shannon 信息指数是生态学中用于度量物种多样性的最常用方法, Lewontin^[13] 将其用于人类遗传多样性的研究, Chalmer 等^[14] 发展了这个方法,将其用于 RAPD 数据的统计分析。其计算公式:

$$H = - \sum P_i \log_2 P_i$$

H 为多样性指数; P_i 是一条扩增产物存在的频率。 H 可计算两种水平的多样性: 种群内遗传多样性 H_{pop} 和种内多样性 H_{sp} 。 H_{pop}/H_{sp} 是种群内遗传多样性所占的比例; $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ 为种群间多样性所占比例。

1.3.4 Nei 基因多样性指数 H 和遗传分化系数 G_{ST} (Nei^[15])

$H = 1 - \sum P_i^2$, P_i 为单个位点上的等位基因的频率。

$G_{ST} = D_{ST}/H_T = H_T - H_S/H_T$; $H_T = 1 - J_i$; $H_S = 1 - (\sum J_i)/s$, s 为种群数目; J_i 是第 i 个种群内的基因一致性。

1.3.5 遗传一致度和遗传距离 据 Nei^[15] 计算种群的无偏遗传一致度和遗传距离, 并根据遗传距离值, 采用 UPGMA 方法对种群聚类。

上述“1.3.3”、“1.3.4”、“1.3.5”的计算都是在根据等位酶分析估算 F_{IS} 的基础上, 计算出等位基因频率后进行的。用 POPGENE^[16] 软件计算。

2 结果分析

2.1 多态位点百分率

15 个寡核苷酸引物共扩增出 155 个 RAPD 位点, 多态位点共计 149 个, 总的多态位点百分率为 96.1%。所用引物在不同种群中所检测出的 RAPD 位点数及多态位点百分率不同(表 1)。WLMGG 和 CHLG5 种群由这 15 个引物检测出的位点数最多, 各为 127; 位点数最少的种群是黄绿型的 2 个种群(CHLY8 和 CHLY9), 分别是 89 和 88。多态位点百分率以灰绿型种群 CHLG5 为最高(79.5%), 其它 6 个灰绿型种群多态位点百分率也都在 70% 以上, 而黄绿型的 2 个种群多态位点百分率仅为 49.4% 和 38.6%。以多态位点百分率排序: CHLG5 > CHLG6 > CHLG8 > WLMGG > WLMYG > CHLG7 > CHLG1 > CHLY8 > CHLY9。

2.2 Shannon 多样性指数

根据统计结果(表 2), 黄绿型种群 CHLY9 的遗传多样性最低(0.122), 其次为 CHLY8(0.57), 也是黄绿型, 黄绿型种群的 Shannon 多样性指数明显低于灰绿型各种群; 顺序排列各种群: CHLG5 > WLMGG > CHLG6 > WLMYG > CHLG7 > CHLG1 > CHLG8 > CHLY8 > CHLY9。由 Shannon 指数估算的羊草的遗传变异有 62.4% 存在于种群内, 37.6% 变异存在于种群间(表 3)。

2.3 Nei 基因多样性指数

由 Nei 指数估算的羊草 9 个不同种群的基因多样性结果列于表 4。由该指数估算的基因多样性仍以黄绿型的两个种群 CHLY9 和 CHLY8 为最低(分别是 0.083 和 0.108), 明显低于 7 个灰绿型种群。9 个种群的多样性指数较 Shannon 指数略低, 按基因多样性大小顺序排列各种群: WLMYG > WLMGG > CHLG5 > CHLG6 > CHLG7 > CHLG1 > CHLG8 > CHLY8 > CHLY9。根据 Nei 指数计算的羊草各种群间的遗传分化为 0.357(表 5), 也就是说, 羊草有 35.7% 的遗传变异存在于种群之间, 64.3% 的变异存在于种群之内。

2.4 基于相似性系数, 由遗传距离指标估算的遗传多样性

应用 5 种已发表的统计方法进行了 6 种计算, 对 RAPD 数据的分析显示出广泛的多样性变异(0.083

表 1 不同种群 15 个引物的 RAPD 位点数和多态位点比率
Table 1 Proportion of polymorphic loci to total RAPD loci in each population detected with 15 primers

种群 Population	样本数 Sample size	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点比率 Proportion of polymorphic loci (P)	位点/引物 Loci/primer
1 CHLG1	12	115	83	0.722	7.7
2 CHLG5	14	127	101	0.795	8.5
3 CHLG6	12	124	98	0.790	8.3
4 CHLG7	10	113	82	0.726	7.5
5 CHLG8	10	100	77	0.770	6.7
6 CHLY8	13	89	44	0.494	5.9
7 CHLY9	12	88	34	0.386	5.9
8 WLMGG	13	127	95	0.748	8.5
9 WLMYG	9	120	89	0.742	8.0
总计 Total	105	155	149	0.961	10.3

表 2 由 Shannon 信息指数估算的羊草各种群的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity for 9 populations of *Leymus chinensis* estimated by Shannon's diversity index

引物 Primer	CHLG1	CHLG5	CHLG6	CHLG7	CHLG8	CHLY8	CHLY9	WLMGG	WLMYG
OPA01	0.148	0.229	0.311	0.083	0.174	0.000	0.24	0.186	0.272
OPG06	0.144	0.269	0.322	0.230	0.285	0.167	0.092	0.193	0.248
OPI11	0.297	0.313	0.399	0.091	0.406	0.265	0.117	0.363	0.335
OPI19	0.071	0.121	0.266	0.326	0.071	0.056	0.000	0.392	0.216
OPN01	0.189	0.266	0.424	0.357	0.290	0.065	0.082	0.382	0.415
OPN12	0.117	0.206	0.268	0.154	0.213	0.048	0.266	0.159	0.265
OPN16	0.535	0.270	0.319	0.359	0.395	0.225	0.000	0.443	0.487
OPN19	0.438	0.421	0.538	0.447	0.362	0.375	0.323	0.313	0.391
OPQ03	0.173	0.28	0.199	0.209	0.381	0.319	0.031	0.211	0.231
OPQ05	0.307	0.519	0.215	0.271	0.106	0.052	0.121	0.43	0.082
OPQ06	0.059	0.097	0.178	0.174	0.093	0.132	0.024	0.152	0.162
OPQ09	0.212	0.406	0.307	0.337	0.355	0.19	0.137	0.207	0.362
OPQ14	0.417	0.270	0.222	0.358	0.161	0.303	0.137	0.173	0.326
OPQ15	0.399	0.306	0.211	0.345	0.199	0.075	0.000	0.334	0.249
OPQ17	0.426	0.363	0.256	0.266	0.228	0.184	0.232	0.500	0.445
平均 Mean	0.262	0.301	0.297	0.268	0.250	0.157	0.122	0.299	0.296

-0.702)(表 6)。虽然不同方法的估算结果在数值上有一些变化,但这几种计算反映出了共同的趋势,也就是,黄绿型种群的遗传多样性低于灰绿型种群。并且,Nei & Li 法和 Jaccard 法揭示出完全一致的种群遗传多样性规律:CHLG8>CHLG6>CHLG5>WLMYG>CHLG7>WLMGG>CHLG1>CHLY8>CHLY9; Apostol 等(1993)和 Rodger 等(1960)的方法估算的结果也一致:WLMYG>CHLG6>CHLG5>WLMGG>CHLG8>CHLG7>CHLG1>CHLY8>CHLY9; Russell 等(1940)方法估算的结果数值最高,种群间遗传多样性由高至低的顺序为:CHLG6>CHLG5>CHLG7>CHLG1>WLMYG>WLMGG>CHLG8>CHLY8>CHLY9。

2.5 遗传距离和遗传一致度

由遗传一致度(表 7,上三角值)两种类型种群间的关系一目了然。灰绿型和黄绿型两种类型种群间遗传一致度值都在 0.8 水平上;除一对种群(CHLG8 与 WLMYG)外,灰绿型内各种种群间遗传一致度值都在 0.9 水平之上。从遗传距离(表 7,下三角值)上看,以 0.12 为界,可以把灰绿型羊草与黄绿型羊草区分开。

UPGMA 聚类图(图 1)更清楚地反映出了各种种群间的关系。长岭腰井子草原上的 5 个灰绿型种群间遗传距离最小,首先聚为一类;五里木草原上的 2 个灰绿型种群也先后与它们聚在一起;黄绿型 2 种群以较大的距离最后与灰绿类型聚为一组。

表 3 由 Shannon 多样性指数估算的种群间遗传分化

Table 3 Partitioning of the genetic diversity between and within 9 populations of *Leymus chinensis* with 15 primers estimated by Shannon's diversity index

引物①	种群内遗传多样性②	总种群遗传多样性③	种群内遗传多样性所占比率④	种群间遗传多样性所占比率⑤
OPA01	0.183	0.268	0.682	0.317
OPG06	0.217	0.343	0.632	0.367
OPI11	0.287	0.436	0.658	0.342
OPI19	0.168	0.347	0.485	0.516
OPN01	0.270	0.454	0.595	0.405
OPN12	0.188	0.326	0.577	0.423
OPN16	0.337	0.519	0.649	0.351
OPN19	0.401	0.576	0.696	0.304
OPQ03	0.226	0.426	0.530	0.470
OPQ05	0.234	0.401	0.583	0.417
OPQ06	0.119	0.156	0.762	0.238
OPQ09	0.279	0.439	0.639	0.365
OPQ14	0.263	0.421	0.624	0.376
OPQ15	0.235	0.423	0.555	0.445
OPQ17	0.322	0.457	0.704	0.296
平均 Mean	0.249	0.399	0.624	0.376

① Primer; ② Within-population genetic diversity H_{pop} ; ③ Total genetic diversity H_{sp} ; ④ Proportion of genetic diversity within-population H_{pop}/H_{sp} ; ⑤ Proportion of genetic diversity among populations $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$

表 4 由 Nei 指数估计的种群基因多样性

Table 4 Gene diversity for 9 populations of *Leymus chinensis* estimated by Nei's index

引物 Primer	CHLG1	CHLG5	CHLG6	CHLG7	CHLG8	CHLY8	CHLY9	WLMGG	WLMYG
OPA01	0.101	0.145	0.202	0.59	0.108	0.000	0.168	0.121	0.181
OPG06	0.089	0.169	0.211	0.150	0.187	0.108	0.059	0.121	0.161
OPI11	0.186	0.199	0.252	0.050	0.263	0.188	0.079	0.231	0.227
OPI19	0.045	0.081	0.179	0.220	0.04	0.027	0.000	0.261	0.144
OPN01	0.120	0.145	0.282	0.243	0.196	0.042	0.056	0.257	0.282
OPN12	0.072	0.125	0.169	0.097	0.135	0.032	0.184	0.095	0.165
OPN16	0.368	0.167	0.208	0.241	0.299	0.161	0.000	0.295	0.333
OPN19	0.301	0.284	0.358	0.291	0.247	0.259	0.227	0.218	0.273
OPQ03	0.103	0.184	0.125	0.126	0.257	0.217	0.016	0.109	0.144
OPQ05	0.197	0.348	0.139	0.183	0.071	0.035	0.085	0.274	0.052
OPQ06	0.035	0.069	0.107	0.107	0.054	0.087	0.011	0.102	0.101
OPQ09	0.136	0.254	0.192	0.233	0.234	0.131	0.092	0.134	0.24
OPQ14	0.276	0.166	0.143	0.239	0.104	0.218	0.088	0.098	0.22
OPQ15	0.265	0.193	0.128	0.225	0.127	0.054	0.000	0.213	0.167
OPQ17	0.295	0.242	0.158	0.181	0.148	0.132	0.156	0.348	0.29
平均 Mean	0.173	0.194	0.192	0.177	0.165	0.108	0.083	0.195	0.197

表 5 羊草 9 个种群间的遗传分化(由 Nei 指数估算)

Table 5 Genetic differentiations among 9 populations of *Leymus chinensis* estimated by Nei's index

引物 Primer	总的基因 多样性 Total gene diversity H_T	种群内的基 因多样性 Within- population gene diversity H_S	种群间遗传分化 Genetic differentiation among populations G_{ST}
OPA01	0.163	0.121	0.258
OPG06	0.214	0.139	0.350
OPI11	0.272	0.186	0.316
OPI19	0.222	0.111	0.500
OPN01	0.290	0.180	0.379
OPN12	0.195	0.119	0.389
OPN16	0.348	0.227	0.348
OPN19	0.391	0.273	0.302
OPQ03	0.278	0.142	0.489
OPQ05	0.242	0.154	0.364
OPQ06	0.087	0.075	0.138
OPQ09	0.278	0.183	0.342
OPQ14	0.272	0.173	0.364
OPQ15	0.269	0.152	0.435
OPQ17	0.295	0.217	0.264
平均 Mean	0.265	0.165	0.357

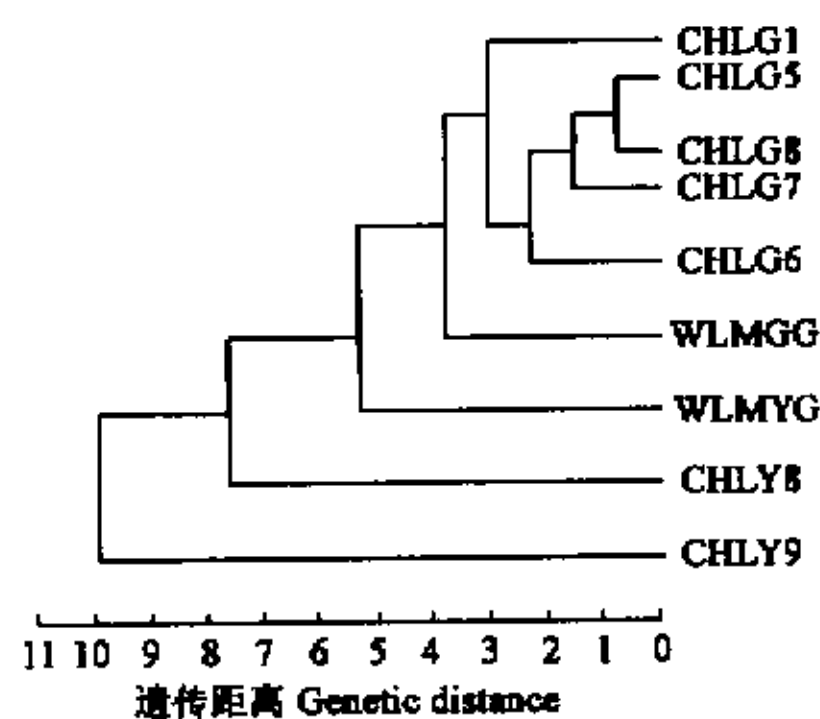


图 1 9 个羊草种群的 UPGMA 聚类

Fig. 1 UPGMA clustering for 9 populations of *L. chinensis* based on RAPD

3 讨论与结论

3.1 关于 RAPD 数据的统计分析

3.1.1 RAPD 揭示羊草种群具有很高的遗传多样性。15 个引物在 9 个种群扩增的 155 位点中多态位点的百分率为 96.1%，在不同种群中所检出的 RAPD 位点及多态位点百分率不同，黄绿型种群多态位点百分率小于 50%，而灰绿型种群多态位点百分率都在 70% 以上。随机扩增多态 DNA 片段共享

度 F (亦称为遗传相似度) 是目前评价种群间、种群内 DNA 水平变异的重要参数。本文选用 5 种方法 6 种运算对羊草种群 RAPD 资料进行了分析。结果表明, 从考查遗传多样性在种群间的相对关系的角度讲, Nei & Li 法与 Jaccard 的方法一致, Apostol 法与 Rodgers 方法一致, Rossell 法显示的是另一种情形 (表 6), 这

—结果与 Maguire 等^[3]的讨论是一致的。但从估值揭示的遗传多样高低来看, Jaccard 与 Roger 法更相近, Apostol 法和 Nei & Li 的未经平方根转换方法结果更一致; Russell 法和 Nei & Li 的平方根转换法估算的值更高些。尽管不同统计分析方法所反映的羊草种群的遗传多样性有所不同, 但它们都揭示出相同的规律, 黄绿型种群的遗传多样性明显低于灰绿型种群(表 6)。

表 6 不同方法估算的遗传多样性值

Table 6 Genetic diversity and the order populations of *Leymus chinensis* estimated from RAPD data using different methods

排序 Order	Nei & Li (1979)(1)*	Nei & Li (1979)(2)*	Jaccard (1901)	Russell (1940)	Apostol (1993)	Rodgers (1960)	Shannon's index(1972)	Nei's index (1973)
1	CHLG8(0.295)	CHLG8(0.539)	CHLG8(0.453)	CHLG6(0.702)	WLMYG(0.254)	WLMYG(0.403)	CHLG5(0.301)	WLMYG(0.197)
2	CHLG6(0.292)	CHLG6(0.539)	CHLG6(0.451)	CHLG5(0.688)	CHLG6(0.247)	CHLG6(0.393)	WLMGG(0.299)	WLMGG(0.195)
3	CHLG5(0.279)	CHLG5(0.528)	CHLG5(0.436)	CHLG7(0.687)	CHLG5(0.242)	CHLG5(0.389)	CHLG6(0.297)	CHLG5(0.194)
4	WLMYG(0.273)	WLMYG(0.524)	WLMYG(0.431)	CHLG1(0.667)	WLMGG(0.228)	WLMGG(0.372)	WLMYG(0.296)	CHLG6(0.192)
5	CHLG7(0.257)	CHLG7(0.506)	CHLG7(0.410)	WLMYG(0.665)	CHLG8(0.218)	CHLG8(0.356)	CHLG7(0.268)	CHLG7(0.177)
6	WLMGG(0.242)	WLMGG(0.490)	WLMGG(0.388)	WLMGG(0.640)	CHLG7(0.215)	CHLG7(0.353)	CHLG1(0.261)	CHLG1(0.172)
7	CHLG1(0.237)	CHLG1(0.483)	CHLG1(0.379)	CHLG8(0.573)	CHLG1(0.205)	CHLG1(0.340)	CHLG8(0.250)	CHLG8(0.165)
8	CHLY8(0.094)	CHLY8(0.301)	CHLY8(0.170)	CHLY8(0.573)	CHLY8(0.089)	CHLY8(0.158)	CHLY8(0.157)	CHLY8(0.108)
9	CHLY9(0.083)	CHLY9(0.286)	CHLY9(0.155)	CHLY9(0.557)	CHLY9(0.081)	CHLY9(0.149)	CHLY9(0.122)	CHLY9(0.083)
平均 Mean	0.228	0.466	0.364	0.639	0.198	0.324	0.250	0.165

* (1) $D=1-F$; (2) $D=\sqrt{1-F}$

表 7 羊草 9 个种群间的遗传一致度和遗传距离

Table 7 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of 9 populations of *Leymus chinensis* detected with 15 primers

种群 Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 CHLG1	—	0.9336	0.9205	0.9132	0.9395	0.8678	0.8145	0.9151	0.9001
2 CHLG5	0.0687	—	0.9315	0.9457	0.9610	0.8594	0.8459	0.9365	0.9055
3 CHLG6	0.0829	0.0710	—	0.9400	0.9286	0.8595	0.8385	0.9107	0.9012
4 CHLG7	0.0908	0.0558	0.0619	—	0.9359	0.8609	0.8253	0.9255	0.9051
5 CHLG8	0.0624	0.0397	0.0741	0.0662	—	0.8709	0.8120	0.9216	0.8927
6 CHLY8	0.1418	0.1516	0.1514	0.1497	0.1382	—	0.8207	0.8360	0.8547
7 CHLY9	0.2052	0.2034	0.1762	0.1920	0.2082	0.1976	—	0.8028	0.8102
8 WLMGG	0.0888	0.0656	0.0936	0.0775	0.0816	0.1792	0.2196	—	0.9145
9 WLMYG	0.1053	0.0993	0.1040	0.0997	0.1135	0.1571	0.2105	0.0894	—

3.1.2 RAPD 标记的显性特征使实验中确定显隐性等位基因频率困难较大。为使 RAPD 数据能反映出更多的信息, 有学者提出, 可以在假定 Hardy-Weinberg 平衡的条件下, 将 RAPD 数据换算成基因频率, 以此分析不同种群的遗传参数^[17]。但是, 这一假设通常无法验证, 有的情况下, 种群确实偏离 Hardy-Weinberg 平衡(HWE)。对此, Chong 等^[18]提出了种群在偏离 HWE 情况下, 一种估测 RAPD 位点上的假定等位基因频率的新方法, 这就是用对同一种群进行等位酶分析计算的 F_{IS} 值估算隐性等位基因频率。本文根据 Chong 等的方法, 用 F_{IS} 值校正种群对 Hardy-Weinberg 平衡的偏离后, 计算显、隐性等位基因频率, 并通过 Shannon 信息指数和 Nei 基因多样性指数估计种群的遗传多样性和种群间的遗传分化。

由 Nei 指数估算的种群遗传多样性比由 Shannon 指数估计的值为低, 但二者揭示的种群间的遗传多样性变化趋势基本是一致的, 灰绿型种群的遗传多样性远高于黄绿型种群(表 6)。并且根据 Shannon 指数和 Nei 指数分别估算的种群间的遗传分化比例基本相同, 分别为 37.6% 和 35.7%。魏伟等^[19]根据

Kongkiatngam^[1]方法,在 HWE 前提下估算等位基因频率,用 Shannon 指数和 Nei 指数分别统计锦鸡儿各种群的遗传多样性,发现二者估算的群体间遗传多样性所占比例相去甚远,该作者认为,根据估算的等位基因频率计算的 Shannon 指数会合理些。本文的结果与魏伟等^[19]分析是不同的,这与二者分析的前提条件不同有关。本文是在对同样的种群进行等位酶分析并计算了各种群的 F_{IS} 值基础上,校正了种群对 HWE 的偏离后,计算相应的等位基因频率,并从而估算 Shannon 和 Nei 指数的,这种分析应当是更为合理的。因此,在本文的前提条件下对 RAPD 数据进行分析,Shannon 和 Nei 的指数都是可行的。

3.2 等位酶和 RAPD 分析结果的比较

等位酶标记已广泛被用于种群遗传结构研究中,随着研究深入,发现等位酶标记并不是基因组的随机代表样本,由此可能会导致种群分析的偏差。等位酶揭示的是编码蛋白质序列的变化,可能受到选择的约束^[20]。与中性位点相比,等位酶分析会高估种群间等位基因的相似度^[21],而随机的 DNA 标记则不受这些影响。RAPD 标记因比其它 DNA 标记(如 RFLPs)简单、利于进行大量位点的分析,被认为比等位酶分析能提供更多的基因组随机样本等,在种群研究中受到重视。但是, RAPD 与等位酶相比,也有其明显的局限性,其中最主要的一点就是,大多数 RAPD 位点是显性的,据 RAPD 进行的等位基因频率估算可能高估种群间的分化^[22,23]。

为深入探查羊草种群的遗传变异性及其分化,同时为更好地理解 RAPD 和等位酶标记的局限及优势,在系列研究中对部分相同的种群及类型分别进行了等位酶^[9]和 RAPD 的分析。在此,对一些参数进行比较(表 8)。

表 8 等位酶和 RAPD 检测的羊草种群遗传多样性、遗传分化结果比较

Table 8 Comparison of genetic diversity and genetic differentiation detected by allozyme and RAPD

参数 Parameter	等位酶 ^[9] Allozyme	RAPD
多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci P	种水平 Species level 黄绿型 Yellow green type 灰绿型 Gray green type	78.6 57.1 67.3
种群分化系数 Coefficients of gene differentiation $F_{ST}(G_{ST})$		0.154 0.357(0.376) ^a
遗传一致度 Genetic identity I	类型内 Within-type 黄绿型 Yellow green type 灰绿型 Gray green type 类型间 Among types	0.914 0.956 0.836
遗传距离 Genetic distance D	类型内 Within-type 黄绿型 Yellow green type 灰绿型 Gray green type 类型间 Among types	0.089 0.049 0.180
		0.198 0.081 0.177

a 括号前数据由 Nei 指数计算而来,括号内数据为 Shannon 指数计算的结果 The datas before parentheses calculated by Nei's index. The datas in parentheses calculated by Shannon Index.

由表 8 可见,对羊草种群的 RAPD 和等位酶分析结果趋势是一致的:多态位点百分率都是黄绿型种群低于灰绿型,但 RAPD 检测的多态位点百分率无论在类型间还是在种水平上都高于等位酶的分析,表明 RAPD 可检测出更高水平的遗传多样性;种群间的遗传分化, RAPD 的结果也高于等位酶,都反映出羊草大部分的遗传变异性存在于种群内,由此也表明这两种类型羊草的种内一致性。RAPD 和等位酶估测的种群间遗传一致度和遗传距离在灰绿型种群间和两种类型种群间的结果相同,数值相差无几,都显示灰绿型种群间遗传一致度大于 0.9,而两种类型间遗传一致度在 0.8 水平上,灰绿型种群间遗传距离远小于两种类型种群间的距离。但是对于黄绿型羊草, RAPD 检测的种群间分化远大于等位酶的分析。总之,由 RAPD 和等位酶揭示的羊草种群的遗传多样性和种群间分化都在可比较的水平上, RAPD 和等位酶显示的遗传多样性格局相似,这些结果与前人的一些研究^[4,24,25]基本一致,这也显示了 RAPD 和等位酶分析作为植物

种群遗传多样性研究的重要工具是具有普遍意义的。

参考文献

- [1] Kongkiatngam P, Waterway M J, Fortin M G, et al. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense*): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. *Euphytica*, 1995, **84**: 237~246.
- [2] D'ennequin M L T, Panaud O, Robert. Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity*, 1997, **78**: 403~409.
- [3] Maguire T L, Margaret S. Genetic diversity in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) with emphasis on *Banksia cuneata*, a rare and endangered species. *Heredity*, 1997, **79**: 394~401.
- [4] Aagaard J, Krutovskii K V, Strauss A H. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity*, 1998, **81**: 69~78.
- [5] Fischer M, Diethart M. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *Amer. J. Bot.*, 1998, **85**(6): 811~819.
- [6] Ren W C (任文伟), Qian J (钱吉), Zheng S Z (郑师章). A comparative study on genetic differentiation of *Leymus chinensis* in different geographic populations. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 1999, **19**(5): 689~696.
- [7] Qian J (钱吉), Ma Y H (马玉虹), Ren W W (任文伟), et al. Comparative study on ecotype differentiation of *Leymus chinensis* in different geographic populations at molecular level. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 2000, **20**(3): 440~443.
- [8] Cui J Z (崔继哲), Q L Y (曲来叶), Zu Y G (祖元刚). Genetic structure of *Leymus chinensis* populations in the center of songnen plain of China. *Bulletin of Botanical Research* (in Chinese) (木本植物研究), 2000, **20**(1): 87~93.
- [9] Cui J Z (崔继哲), Qiu L Y (曲来叶), Zu Y G (祖元刚). Genetic diversity and differentiation of two ecotypes of *Leymus chinensis* populations in microhabitat-allozyme analysis. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 2000, **20**(3): 434~439.
- [10] Cui J Z (崔继哲), Zu Y G (祖元刚), Guan X D (关晓铎). Genetic differentiation in *Leymus chinensis* populations revealed by RAPD markers I: variation on the frequencies of amplified fragments. *Bulletin of Botanical Research* (in Chinese) (植物研究), 2001, **21**(2): 272~277.
- [11] Zhang H Q (张恒庆), An L J (安利佳), Zu Y G (祖元刚). Effect on the experimental results of the content of compositions in RAPD experiment of *Pinus koraiensis*. *Bulletin of Botanical Research* (in Chinese) (植物研究), 1999, **19**(2): 183~188.
- [12] Armstrong J, Gibbs A, Peakall R, et al. *RAPDISTANCE: random amplified polymorphic DNA analysis*. Computer program distributed by the Australian National University, 1994.
- [13] Lewontin R C. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.*, 1972, **6**: 381~398.
- [14] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, et al. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 1992, **69**: 465~472.
- [15] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, **19**: 583~590.
- [16] Francis C Y, Yang R C, Boyle T. *POPGENE* version 1.21 Microsoft Window-based freeware for Population Genetic Analysis. 1997.
- [17] Lynch M, Milligan B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.*, 1994, **3**: 91~97.
- [18] Chong D K X, Yang R C, Yeh F C. Nucleotide divergence between populations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) estimated with RAPDs. *Curr. Genet.*, 1994, **26**: 374~376.
- [19] Wei W (魏伟), Wang H X (王洪新) and Hu Z A (胡志昂), et al. Primary studies on molecular ecology of *Caragana* spp. populations distributed over maowusu sandy grassland; from RAPD data. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 1999, **19**(1): 16~22.
- [20] Clegg M T. Molecular diversity in plant populations. In: Brown A. H. D., Clegg M. T., Kahler A. L. et al. eds. *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 1989, 98~115.
- [21] Altukhov Y P. The role of balancing selection and overdominance in maintaining allozyme polymorphism. *Genetica*, 1991, **85**: 79~90.
- [22] Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**: 6369~6373.
- [23] Szmidt A, Wang X, Lu M. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity*, 1996, **76**: 412~420.
- [24] Owuor E D, Fahima T, Beiles A. Population genetic response to microsite ecological stress in wild barley, *Hordeum spontaneum*. *Molecular Ecology*, 1997, **6**: 1177~1187.
- [25] Wang C, Wang W, Chiang C. Low genetic variation in *Amentotaxus formosana* Li revealed by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA markers. *Heredity*, 1996, **77**: 388~395.