

## 鄂尔多斯高原不同降雨量地区中间锦鸡儿(*Caragana davazamcii* Sancz)种群的 ISSR 遗传分析

杨明博<sup>1,2</sup> 杨劼<sup>1,\*</sup> 杨九艳<sup>1,3</sup> 臧春鑫<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021; <sup>2</sup> 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875; <sup>3</sup> 内蒙古医学院药用植物学系, 呼和浩特 010059

**提要** 采用简单重复间序列(ISSR)方法, 对鄂尔多斯高原从东向西降雨量逐渐减少选5个地区的中间锦鸡儿种群进行分子生态学研究的结果表明, 随着这一地区多年平均降雨量由东向西的逐渐减少, 中间锦鸡儿种群遗传多样性有所增加, 大部分变异发生在种群内(79.95%), 属异交类型, 中间锦鸡儿群体间遗传距离缓慢增加, 遗传一致度降低。这种随着水分递减呈现生态梯度变异的现象, 说明水分变化特别是长期形成的水分条件对中间锦鸡儿的遗传多样性可能有一定的影响。  
**关键词** 鄂尔多斯高原; 中间锦鸡儿; ISSR; 遗传多样性

## Genetic Analysis Based on ISSR of *Caragana davazamcii* Sancz Populations in Different Precipitation Areas in Erdos Plateau

YANG Ming-Bo<sup>1,2</sup>, YANG Jie<sup>1,\*</sup>, YANG Jiu-Yan<sup>1,3</sup>, ZANG Chun-Xin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; <sup>3</sup>Department of Drug Botany, Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010059, China

**Abstract** The results showed that the Nei's gene index and Shannon's information index increased along with changes of the habitats from east to west and with lack of average annual rainfall, as well as genetic diversity increased. It was found that total genetic diversity of five populations ( $H_T$ ) was 0.2963, genetic diversity within populations ( $H_S$ ) was 0.2269, genetic diversity among populations ( $D_{ST}$ ) was 0.0594, genetic differentiation coefficient ( $G_{ST}$ ) was 0.2005, and gene flow was 1.9936. 79.95% of molecular variation in *Caragana davazamcii* Sancz existed within populations, while few of which existed among populations, so it belonged to hybridization. Genetic distance between five populations was small, but it increased slowly with changes of the habitats from east to west, while genetic identity decreased, it showed ecological gradient variation according to lack of water. All these indicated that moisture changes especially long-term moisture conditions formed had an effect on genetic diversity of *C. davazamcii*.

**Key words** Erdos plateau; *Caragana davazamcii* Sancz; ISSR; genetic diversity

鄂尔多斯高原处于内蒙古地区典型的草原和荒漠化草原以及荒漠的过渡地带, 景观类型复杂多样, 横跨5种生态气候带和5种草原植被类型区。灌木类是鄂尔多斯高原的优势生活型植物(李新荣和张新时1999), 中间锦鸡儿(*Caragana davazamcii* Sancz)则是典型草原和荒漠草原带的沙生旱生灌木, 在固定和半固定沙丘上可成为建群种, 形成沙地灌丛群落, 也常散生于沙质荒漠草原群落中, 组成灌丛化草原群落, 中间锦鸡儿具有抗旱、抗寒、耐瘠薄、繁殖性强等特点(周道玮1989), 可防风固沙、保持水土、改善局部小环境, 因此受到人们的广泛关注。关于中间锦鸡

儿的研究主要集中在以下几个方面: (1) 中间锦鸡儿作为小叶锦鸡儿(*C. microphylla* Lam)和柠条锦鸡儿(*C. korshinskii* Kom)生态地理替代的中间过渡类型(马成仓等2003; 周海燕等2002); (2) 系统遗传研究(高丽锋等2002; 周永刚等2001); (3) 化学成分分析(孙智华等2004; 施蛟等2003)。选择一个合适的水分梯度, 研究其遗传特征还未见报道, 本文在鄂尔多斯高原由东向西按照水分逐渐减少的

收稿 2005-10-08 修定 2006-02-27

资助 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJ03163)和新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0260)。

\*通讯作者(E-mail: jyang@mail.imu.edu.cn, Tel: 0471-4992513)。

梯度进行选点,采用简单重复间序列(inter simple sequence repeat, ISSR)分子标记技术研究中间锦鸡儿遗传特征对水分变化的表现,从而有可能理解生态过渡性与植物物种遗传结构过渡性的联系和揭示中间锦鸡儿的分子生态适应机制,为黄土丘陵地区大面积种植中间锦鸡儿用以固沙,防止水土流失提供参考。

ISSR技术是一种以PCR扩增为基础的分子标记技术,所用引物是基于简单序列重复而设计的寡核苷酸序列,该技术的特点是以16~18个核苷酸的重复序列为引物(3'端有1~2个选择性简并碱基)直接在基因组DNA中进行PCR扩增,以琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳即可检测,扩增谱带丰富(何平1998)。有人根据这些特点已应用于指纹图谱、遗传作图、种质资源鉴定、基因定位、遗传多样性、进化、系统发育和分子标记育种的研究(Dirlewanger等1998; Arcade等2000; Casasoli

等2001; Cekic等2001; Kantety等1995; Prevost和Wilkinson 1998)。但近些年来主要集中在作物研究中,而在野生种群中很少见到报道,本文选用ISSR分子标记利用其可以产生丰富的多态位点和具有高多态性区分种以下分类群的优点,研究中间锦鸡儿随着水分减少时的种内遗传变异情况。

## 材料与方 法

于2004年7月,在鄂尔多斯高原由东至西按照水分逐渐减少的梯度选5个点随机采取中间锦鸡儿(*Caragana davazamcii* Sancz)植株的叶片,这5个点分别位于典型草原带、荒漠草原带以及分布于两带之间的沙地上,5个采样点的多年平均降雨量逐渐减少,湿润系数也逐渐降低,这些地带的基本情况见表1,年均降雨量是近30年观察的资料。于每个采样点分别随机选取20株中间锦鸡儿叶片,用变色硅胶干燥后进行ISSR分析。

表1 中间锦鸡儿样品采集地概况

Table 1 The general situation of the sampling sites of *C. davazamcii*

采样点	纬度	经度	海拔/m	年均降水量/mm	湿润系数	生境特点
I	N 39°23' 47"	E 110°22' 42"	1 217	322	>0.4	典型草原区的覆沙地
II	N 39°23' 24"	E 109°48' 25"	1 372	286	0.4~0.35	典型草原区的覆沙硬梁
III	N 39°2' 1"	E 109°22' 44"	1 309	262	0.35~0.3	毛乌素沙地半固定沙丘
IV	N 38°36' 55"	E 108°42' 58"	1 348	251	0.25~0.23	毛乌素沙地覆沙硬梁
V	N 39°14' 30"	E 108°2' 27"	1 375	221	0.23~0.2	荒漠草原平缓的沙质地

植物总DNA采用CTAB法(Doyle 1991)抽提,ISSR扩增反应条件经优化实验确定为25 μL体系,各反应成分用量分别为:10×PCR缓冲液[100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、80 mmol·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 9.0] 2.5 μL、2.0 μL的25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、2.0 μL的2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP、1 U的Taq酶、1 μL的引物、20 ng模板DNA, ddH<sub>2</sub>O补足至25 μL。上述药品全部购自上海生物工程公司。ISSR反应程序:首先94℃预变性5 min,然后进行45个循环为94℃ 45 s、54℃ 1 min、72℃ 1.5 min,72℃终延伸5 min,之后于4℃下保存。反应在PTC-100TM型PCR热循环仪(美国MJ Research公司)上进行。

DNA扩增产物在0.5×TBE (0.45 mol·L<sup>-1</sup> Tris-硼酸、0.01 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0)缓冲系统

中,用含有0.5 g·L<sup>-1</sup> EB的1.5%琼脂糖电泳分离,用100 bp的DNA Marker作为分子量标记,电压5 V·cm<sup>-1</sup>,时间2 h,WFH-701型多功能紫外投射反射仪上观察并照相。

ISSR扩增产物以0或1统计建立二元数据矩阵,扩增带存在时赋值1,否则赋值0。采用POPGEN32软件,计算多态性位点比率、Nei遗传多样性指数、Shannon信息指数、总群体的基因多样性( $H_T$ )、群体内基因多样性( $H_S$ )、群体间基因多样性( $D_{ST}$ )、基因分化系数( $G_{ST}$ )、遗传距离(D)和遗传一致度(I)。

## 实验结果

### 1 ISSR产物的多态性

选用2个来自不同地区的中间锦鸡儿个体,

以19条引物的筛选, 选定13条可产生多态性且重复性好的引物进行ISSR扩增。从13条引物扩增的结果(表2)。可以看出, 扩增共产生151条带, 平均每条引物产生11.6条。在151条带中, 有148条多态带, 平均每条引物产生11.4条, 多态性位点比率达98.01%。绝大多数位点集中在

300~2 000 bp (图1), 也有一些少数特异性位点在此范围以外, 虽然多态性位点是对遗传多样性的一个粗略估计, 但从中可以看出中间锦鸡儿丰富的遗传多样性, 这也可能是中间锦鸡儿在鄂尔多斯高原地区广泛分布的遗传学基础。

5个地区的中间锦鸡儿种群随着鄂尔多斯高原

表2 ISSR扩增引物、序列和扩增结果

Table 2 List of ISSR primer labels, primer sequences and amplification results

引物编号	序列(5'→3')	总扩增带数	多态性带数	多态性位点比率/%
AW64747	ACACACACACACACACAG	13	13	100.00
AW64749	TGTGTGTGTGTGTGTGC	6	6	100.00
AW64750	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	15	15	100.00
AW64751	TATTATTATTATTATTAT	14	14	100.00
AW77934	AGAGAGAGAGAGAGAGC	13	13	100.00
AW77935	AGAGAGAGAGAGAGAGG	12	12	100.00
AW77936	GAGAGAGAGAGAGAGAC	11	11	100.00
AW77937	CACACACACACACACAG	6	6	100.00
AW77938	GAGAGAGAGAGAGAGAA	6	6	100.00
AW77939	AGAGAGAGAGAGAGAGTC	14	13	92.86
AW77940	GAGAGAGAGAGAGAGAGG	11	11	100.00
AW77941	GAGAGAGAGAGAGAGAAT	14	13	92.86
AW77943	GGAGAGGAGAGGAGA	16	15	93.75
总计		151	148	98.01

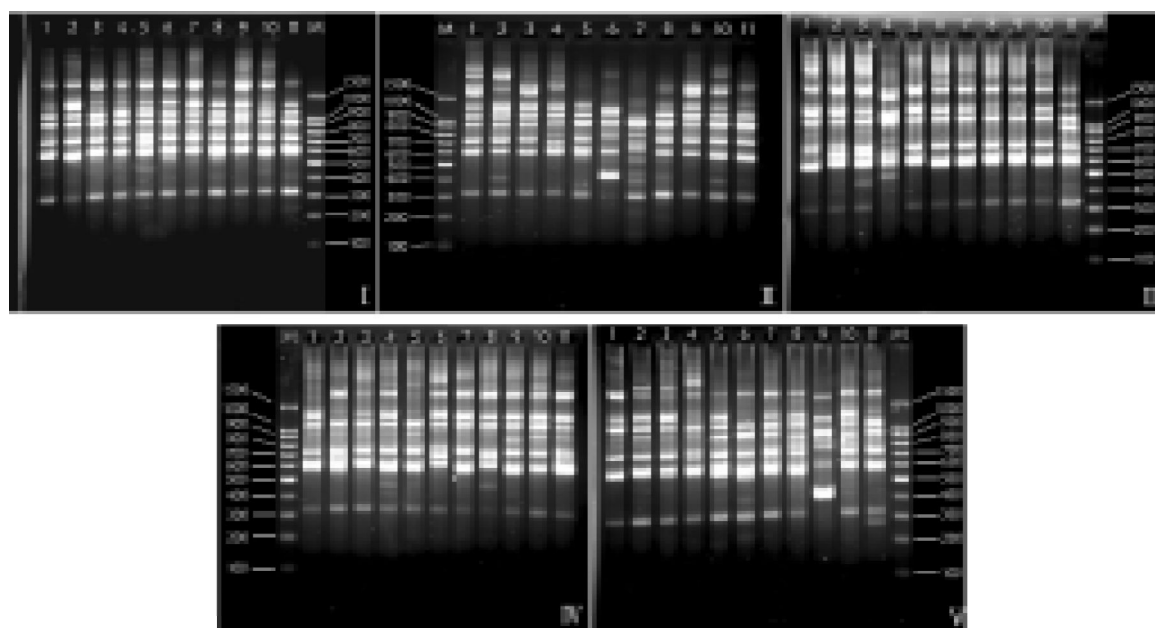


图1 引物AW64751对5个地区中间锦鸡儿种群的扩增谱带

Fig. 1 PCR-amplified fragment patterns with AW64751 primer in *C. davazancii* populations in different areas

图中 I、II、III、IV、V 分别代表 5 个采样点的中间锦鸡儿种群。

由东向西水分逐渐的变少,多态性位点有增加的趋势(表3),典型草原区的中间锦鸡儿种群的多态性位点为98个,多态性位点比率为64.9%,到了荒漠草原区则达到117个,多态性位点比率达到77.48%。RAPD的测定结果也表明,少数多态DNA在群体里的频率与所在地区的水分状况有关,滩地为零或很低,环境越干旱,频率越高,甚至为100%(魏伟等1999)。这个现象可能是由于这少数位点与适应水分逆境的基因紧密连锁,自然选择导致其频率呈梯度分布。这说明随着水分的减少,中间锦鸡儿在遗传上产生了一定的适应性分化,向着遗传多样性增加的趋势发展。

表3 不同区域中间锦鸡儿种群多态性位点的差异  
Table 3 Difference of polymorphic loci of *C. davazamcii* populations in different areas

种群编号	多态性位点	多态性位点百分率/%
I	98	64.90
II	113	74.83
III	109	72.19
IV	107	70.86
V	117	77.48

## 2 中间锦鸡儿遗传多样性指数

从表4可以看出,中间锦鸡儿种群总的Nei遗传多样性指数为0.2963,总的Shannon信息指数为0.4542,随着鄂尔多斯高原各地区由东向西的变化,各种群的2种指数均有所升高。由Nei遗传多样性指数估算各引物所检测到的基因多样性中,II号地区种群最高,为0.2529;I号的种群最低,为0.2093;按顺序为:II>V>III>IV>

表4 不同区域中间锦鸡儿种群Nei遗传多样性指数和Shannon信息指数

Table 4 Nei's gene diversity index and Shannon information index of *C. davazamcii* populations in different areas

种群编号	Nei 遗传多样性指数	Shannon 信息指数
I	0.2093	0.3177
II	0.2529	0.3789
III	0.2397	0.3595
IV	0.2355	0.3545
V	0.2469	0.3758
总计	0.2963	0.4542

I。由Shannon信息指数估算各引物检测到的基因多样性中,同样是II号的种群最高,为0.3789;I号生境种群最低,为0.3177;按顺序排列为:II>V>III>IV>I,与Nei遗传多样性指数估算的中间锦鸡儿各群体的遗传多样性的大小顺序相同。

## 3 中间锦鸡儿种群的遗传结构和基因流

从表5可以看出,5个地区的中间锦鸡儿种群的总基因多样性 $H_T$ 为0.2963,其中存在于种群内的基因多样性 $H_S$ 为0.2369,种群间的基因多样性 $D_{ST}$ 为0.0594。不同地区种群间遗传分化系数 $G_{ST}$ 为0.2005,即种群间的遗传变异占种群总的遗传多样性的20.05%,种群内绝大部分是变异的(79.95%)。根据 $Nm=0.5 \times (1-G_{ST}) / G_{ST}$ 计算出不同地区中间锦鸡儿种群的基因流(Nm)为1.9936。说明中间锦鸡儿种群内变异显著,种群间有基因交流。

表5 不同区域中间锦鸡儿种群 $H_T$ 、 $H_S$ 、 $G_{ST}$ 和Nm

Table 5  $H_T$ ,  $H_S$ ,  $G_{ST}$  and Nm of *C. davazamcii* populations in different areas

	样品数/个	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$	Nm*
平均值	55	0.2963	0.2369	0.2005	1.9936
标准差		0.0234	0.0171		

$$*Nm=0.5 \times (1-G_{ST}) / G_{ST}$$

## 4 中间锦鸡儿种群间的遗传距离与聚类分析(UPGMA法)

从中间锦鸡儿种群的遗传距离分析结果(表6)可知,随着鄂尔多斯高原由东向西水分逐渐减少,种群遗传距离在加大,基本上反应了一种地

表6 不同区域中间锦鸡儿种群遗传距离(下三角)和遗传一致度(上三角)

Table 6 Nei's genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal) of *C. davazamcii* populations in different areas

种群编号	I	II	III	IV	V
I	—	0.9267	0.9176	0.9053	0.8948
II	0.0761	—	0.8903	0.8769	0.8874
III	0.0860	0.1162	—	0.9384	0.8998
IV	0.0995	0.1314	0.0636	—	0.8898
V	0.1112	0.1194	0.1056	0.1167	—

理距离的变化,典型草原区中间锦鸡儿种群(I)与荒漠草原区中间锦鸡儿种群(V)遗传距离最大(0.1112),说明遗传分化程度在逐渐增强,表明不同地区条件的变化,特别是水分条件的变化对中间锦鸡儿种群遗传多样性有一定的影响。

图2是根据遗传距离用非加权对组算术平均值法(UPGMA)作聚类分析得到的。从图2可见,中间锦鸡儿的5个种群随着地区由东向西的变化,逐级聚在一起,典型草原区(I、II)的种群聚为一类;沙地生境(III、IV)的种群聚为一类;荒漠草原区(V)的种群各为一类。说明随着环境水分的减少,种群的分化程度逐渐增加。

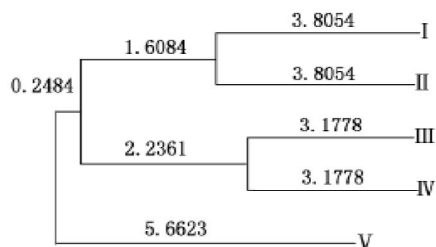


图2 不同区域中间锦鸡儿种群ISSR分析的UPGMA聚类图

Fig.2 UPGMA dendrogram of *C. davazamcii* populations in different areas

## 讨 论

对鄂尔多斯高原从东向西降雨量逐渐减少的不同地区的5个中间锦鸡儿55个种群个体用13条引物进行ISSR扩增,共产生151条带。在151个ISSR扩增位点中,仅有3个位点上有共同的扩增片段,说明中间锦鸡儿具有极丰富的遗传多样性。另外,随着该高原降雨量的由东向西的逐渐减小,中间锦鸡儿的遗传多样性增加,并且大部分变异发生在种群内,种群间有基因交流,属异交类型,这些也可能是中间锦鸡儿分布广泛和可以大面积种植的原因及遗传学基础。

据报道,中间锦鸡儿种群在鄂尔多斯高原从典型草原到荒漠化草原以及这两带之间的沙地上遗传多样性呈增大趋势。中间锦鸡儿是锦鸡儿属在草原区形成的水分系列上地理替代类群小叶锦鸡儿群系里的种(周道玮等1994),并且在鄂尔多斯高原地区纬度跨度不大,经向跨度大,因此,相

对于其他环境因子,水分条件是影响鄂尔多斯高原地区中间锦鸡儿遗传多样性最显著的因子。从东至西随着水分梯度的降低,即从典型草原到荒漠化草原,中间锦鸡儿分子适应机制出现了一些变化,但中间锦鸡儿是否发生生态型的分化还有待进一步研究。生态型是种以下同种植物分布在不同地区适应于不同生态条件所形成的遗传类群。业已证明,常见的和广布的种内常常在形态和生理特性上有明显的生态型分化,在不同生境条件下,每一个生态型在个体行为上都有不同的反应能力,在大多数情况下,不同生态型在不同样地区仍然保持它们的特征(刘志彦等2004)。从本文结果来看,虽然中间锦鸡儿在不同降雨地区发生了一些遗传上的改变,但这种改变是否稳定,还待进一步研究。另外,生态型的分化并不是植物种内唯一的生态变异模式。大多数情况下,由于生境或地理因子呈梯度变化,植物即呈现为梯度变异,因此很难找出各类群间的明显差异。广泛分布的种其大部分变异是梯度变异所构成,一些性状随着生境系列从一端到另一端的变化有很明显的级差,这种变异称为生态梯度变异。中间锦鸡儿可能正是遵循这一方式变化的。

## 参考文献

- 高丽锋, 邓馨, 王洪新(2002). 毛乌素沙地中间锦鸡儿根瘤菌遗传多样性及16S rDNA全序列分析. 微生物学报, 42(6): 649~656
- 何平(1998). 真核生物中的微卫星及其应用. 遗传, 20: 42~47
- 李新荣, 张新时(1999). 鄂尔多斯高原荒漠化草原与草原化荒漠灌木类群生物多样性的研究. 应用生态学报, 10(6): 665~669
- 刘志彦, 陈北光, 谢正生, 苏志尧(2004). 植物生态型分类研究进展. 生态科学, 23(4): 365~369
- 马成仓, 高玉葆, 刘惠芬, 王金龙, 郭宏宇(2003). 小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿地理渐变性I. 生态学和RAPD证据. 植物学报, 45(10): 1218~1227
- 施蛟, 陈博, 孙智华, 胡昌奇(2003). 中间锦鸡儿黄酮类成分的研究. 药学学报, 38(8): 599~602
- 孙智华, 张甦, 胡昌奇(2004). 柠条醇A衍生物的制备. 中国医药工业杂志, 35(4): 197~199
- 魏伟, 王洪新, 胡志昂(1999). 毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究: RAPD证据. 生态学报, 19(1): 16~22
- 周道玮(1989). 锦鸡儿属植物地理学研究[学位论文]. 呼

- 和浩特: 内蒙古大学
- 周道玮, 王爱霞, 李宏(1994). 锦鸡儿属锦鸡儿组植物分类与分布的研究. 东北师大学报, 2: 64~68
- 周海燕, 张景光, 赵亮(2002). 湿润条件下几种锦鸡儿属灌木的气体交换特征及调节机制. 中国沙漠, 22 (4): 316~320
- 周永刚, 王洪新, 胡志昂(2001). 毛乌素沙地中间锦鸡儿群体繁育系统的变化. 植物学报, 43 (12): 1307~1309
- Arcade A, Anselin F, Rampant PF, Lesage MC, Pâques LE, Prat D (2000). Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. Theor Appl Genet, 100: 299~307
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, Villani F (2001). A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. Theor Appl Genet, 102: 1190~1199
- Cekic C, Battey NH, Wilkinson MJ (2001). The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. Theor Appl Genet, 103: 540~546
- Dirlewanger E, Pronier V, Parvery C, Rothan C, Guye A, Monet R (1998). Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers. Theor Appl Genet, 97: 888~895
- Doyle J (1991). DNA protocols for plants—CTAB total DNA isolation. In: Hewitt GM, Johnston A (eds). Molecular Techniques in Taxonomy. Berlin: Springer, 283~293
- Kantety RV, Zeng X, Bennetzen JL, Zehr BE (1995). Assessment of genetic diversity in popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Mol Breed, 1: 365~373
- Prevost A, Wilkinson MJ (1998). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor Appl Genet, 98: 107~112