

文章编号:1001-1498(2004)05-0605-05

利用 RAPD 标记对珙桐地理种群遗传分化的研究

宋丛文^{1,2}, 包满珠¹

(1. 华中农业大学,湖北 武汉 430070; 2. 湖北省林业科学研究所,湖北 武汉,430079)

摘要:利用 RAPD 标记对珙桐全分布区 5 个种群的遗传多样性进行了分析。研究发现,珙桐具有丰富的遗传多样性,但由于小种群效应,以及缺乏有效的基因流,种群间遗传分化巨大,26%的遗传变异存在于种群间。使用 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析,可以很好地将珙桐划分为东南部和西北部两个种源区,为今后珙桐的种质资源保存和开发利用研究提供理论依据。

关键词:珙桐;RAPD;地理种群;遗传分化

中图分类号:Q75 **文献标识码:**A

珙桐(*Davidia involucrata* Baill.)系我国特有的珙桐科(Davidioideae)单型属植物,其起源古老,是第三纪古热带植物区系的子遗种,1896年由法国人岱维斯首次发现,被列为国家一级保护珍稀濒危植物^[1],也是世界著名的子遗活化石观赏木本花卉植物。仅分布在甘肃东南部的文县、陕西西南部的安康地区、湖北的神农架及恩施各县市、湖南的武陵山区、贵州的梵静山、四川的西南部及云南北部共 7 省 40 多个县市,分布范围为 23°25'~33°38' N,99°05'~111°18' E,呈星散状分布,现有的原生群落面积十分有限^[2]。

研究种群间的遗传分化是探讨植物适应性、物种形成过程及进化机制的基础,也是保护生物学和遗传资源学的核心^[3]。焦健等^[4]对珙桐种群的分布格局、变化趋势、种间联结性等进行过研究,但对我国特有种珙桐的遗传多样性方面的研究报道很少。本文利用 RAPD 标记研究珙桐全分布区地理种群间的遗传分化与变异模式,为有效保护和开发利用珙桐种质资源提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据珙桐的分布特点,在甘肃文县、湖北神农架、湖北宣恩、四川峨眉山、贵州梵静山等 5 个地方,选择具有连续分布特征的天然林分作为研究对象群体,在全林分随机抽取 30~50 株珙桐树(每两珙桐株间距不少于 50 m),分别单株采集 10~15 片叶,置于加入了足量干燥剂的塑料袋中密封,带回实验室后置于 -20℃ 的冰箱中保存供试。

收稿日期:2004-04-13

基金项目:湖北省林业局重点项目(2002LK015)

作者简介:宋丛文(1965—),男,湖北麻城人,高级工程师。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取 5个群体共186份样品(湖北宣恩40份、四川峨眉山41份、贵州梵净山37份、湖北神农架30份、甘肃文县38份),采用2×CTAB法提取DNA^[5]。测定DNA的浓度和纯度,通过琼脂糖电泳检查DNA的完整性,-20℃保存备用。

1.2.2 引物筛选 随机引物采用Operon公司引物系列A、B、C、D共80个引物,经预备试验选择能产生多态性、清晰明亮的谱带且重复性强的13个引物,对所有个体DNA进行扩增。

1.2.3 RAPD扩增及产物分离 RAPD扩增反应条件:94℃预变性3min;然后进入40个循环,每个循环94℃变性1min,45℃退火1min,72℃延伸2min;循环完成后于72℃延伸7min,最后于4℃保存。反应采用20μL体系:H₂O 11.6μL,1×Buffer 2μL,2mmol L⁻¹MgCl₂ 0.8μL,0.2mmol L⁻¹M_dNTP 0.4μL,0.4μmol L⁻¹Primer 2μL,1uTaq 0.2μL,30μg μL⁻¹DNA 3μL。扩增产物在10g kg⁻¹含溴化乙锭的琼脂糖凝胶中电泳分离,最后在紫外灯下用拍照记录结果(图1)。

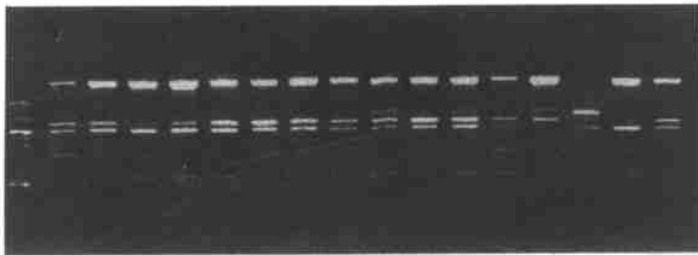


图1 引物OPB05的RAPD扩增产物在部分珙桐地理种群样品中的分离

1.3 数据处理

RAPD谱带按1/0标记,利用POPGENE软件^[6]进行数据分析。首先计算衡量种群遗传变异的多态百分率、Nei's基因多样性^[7],以度量珙桐各地理种群的遗传变异。采用F统计量分析种群的基因多样性,估算基因分化系数,以研究确定珙桐种群间的遗传分化。基于地理种群间Nei's无偏遗传距离的估算,用非加权成组配对法(UPGMA)对5个地理种群进行聚类分析,构建聚类树状图。

2 结果分析

2.1 引物及其检测结果

用13个随机引物对5个天然珙桐种群共186个个体的基因组DNA进行了RAPD分析,每个引物检测到的位点数在1~12之间,共检测到101个可重复的位点。平均每个引物检测到的位点为7.77。

各引物名称、序列及检测带数见表1。

表 1 13 个随机引物序列及扩增的总带数

引物	引物序列(5'-3')	总带数	引物	引物序列(5'-3')	总带数
OPA03	AGTCAGCCAC	12	OPB05	TGCTCCCTTC	12
OPA05	AGGGGICTTG	2	OPB06	TGCTCTGCC	11
OPA11	CAATCGCCGT	7	OPB11	GTA GACCCGT	7
OPA13	CAGCACCCAC	7	OPB17	AGGGAACGAG	8
OPB01	GITTCGCTCC	4	OPB18	CCACAGCAGT	12
OPB03	CATCCCCCTG	7	OPD01	ACCGCGAAGG	1
OPB04	GGACTGGA GT	11	(总计)		101

2.2 多态位点比率及 Nei 's 基因多样性

多态百分率和 Nei 's 基因多样性是检验种群内遗传多样性的常用指标。从表 2 可见,珙桐各种群的多态百分率很高,平均达到 75.84%,不同种群间多态百分率差异较大,最高的是四川峨眉山种群,高达 85.15%,其次是贵州梵静山种群、湖北神农架种群,再次为甘肃文县种群,最低为湖北宣恩种群,只有 64.36%。从 Nei 's 基因多样性来看,珙桐种群具有较为丰富的遗传多样性,其种群平均值为 0.2476,高于一般针阔叶树种 0.206 的估算值^[8]。种群间基因多样性相差巨大,多数种群的遗传多样性丰富,以贵州梵静山种群、湖北神农架种群和四川峨眉山种群遗传变异水平最高,分别达到 0.2795、0.2774 和 0.2600,湖北宣恩种群内的遗传变异水平较低,只有 0.1989。

表 2 5 个珙桐地理种群的多态百分率和 Nei 's 基因多样性

地理种群	多态百分率/ %	Nei 's 基因多样性
1. 湖北宣恩	64.36	0.1989
2. 四川峨眉山	85.15	0.2600
3. 贵州梵静山	80.20	0.2795
4. 湖北神农架	79.21	0.2774
5. 甘肃文县	70.30	0.2223
平均	75.84	0.2476

2.3 遗传分化系数

基因分化系数估算结果(见表 3)显示,珙桐群体间的遗传分化达到 26%。珙桐有 26%左右的遗传变异存在于种群间,而 74%左右的遗传多样性存在于种群内,基因流 Nm 只有 1.4239,这一估算值近似于我国濒危植物马褂木(*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.)的研究结果^[9]。珙桐是古老的孑遗植物,虽然在我国 7 省 40 多个县(市)有分布,但呈星散间断分布,多数种群个体数少。这是生境片断化,小种群效应和距离隔离效应的结果,使得珙桐种群内的变异程度降低,而种群间的遗传分化程度加大。

表 3 珙桐地理种群的遗传分化系数

树种	总的种群基因多样性 (<i>H_T</i>)	种群内基因多样性 (<i>H_s</i>)	种群间基因多样性 (<i>D_{st}</i>)	基因分化系数 (<i>G_{st}</i>)	基因流 (<i>N_m</i>)
珙桐	0.3345	0.2476	0.0869	0.2599	1.4239
马褂木	0.3911	0.2568	0.1343	0.3434	

引自文献[9]

2.4 Nei's 遗传距离及 UPGMA 聚类分析

表 4 给出了珙桐 5 个种群间的遗传同一性和 Nei's 遗传距离,并据此使用 UPGMA 聚类法得出了聚类树形图(图 2)。图 2 表明,可以按地理区域将珙桐划分为两个种源区,第一个种源区是东南种源区,第二个种源区是西北种源区。从珙桐种群间的遗传距离来看,最大遗传距离存在于湖北宣恩与甘肃文县之间,最小遗传距离在湖北神农架与贵州梵净山之间。

表 4 珙桐 5 个地理种群 Nei's 遗传同一性(对角线以上)与遗传距离

地理种群	湖北宣恩	四川峨眉山	贵州梵净山	湖北神农架	甘肃文县
湖北宣恩		0.863 7	0.878 1	0.887 8	0.814 1
四川峨眉山	0.146 6		0.858 0	0.845 8	0.857 7
贵州梵净山	0.129 9	0.153 1		0.932 1	0.828 5
湖北神农架	0.119 0	0.167 5	0.070 3		0.838 2
甘肃文县	0.205 7	0.153 5	0.188 1	0.176 4	

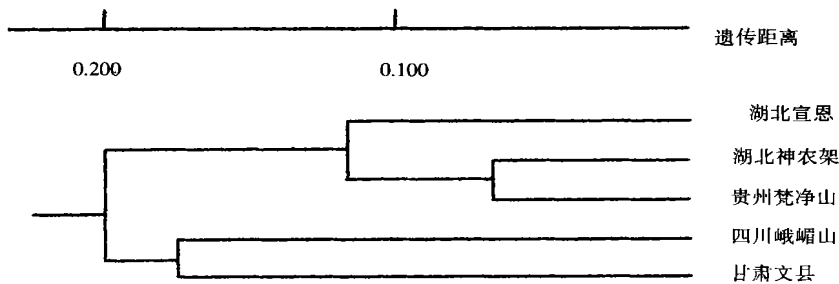


图 2 5 个地理种群 UPGMA 聚类法得出的树状图

3 小结

珙桐现残遗和间断分布于我国甘肃、陕西、湖北、湖南、四川、云南、贵州等地,面积约 4 500 hm^2 ,呈星散状分布。利用 RAPD 标记对珙桐全分布区 5 个种群进行遗传多样性分析结果表明,珙桐虽因小种群效应和距离隔离效应经历了严重的遗传漂变,种群内仍具有丰富的遗传变异。但是,由于珙桐种群受小种群效应,以及缺乏有效的基因流($N_m = 1.4239$)和致濒机制的影响,造成珙桐种群间的遗传分化巨大,26%的遗传变异存在于种群间,与我国濒危树种马褂木^[9]、银杉(*Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang)^[10]等相似,而与广布性树种相异。利用 RAPD 标记在 DNA 水平上可以很好地将珙桐划分为东南和西北两个种源区,为今后开展珙桐的种质资源保存和开发利用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 付立国,金鉴明. 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1992,474~475
- [2] 张清华,郭泉水,徐德应,等. 气候变化对我国珍稀濒危树种——珙桐地理分布的影响研究[J]. 林业科学,2000,36(2):47~52
- [3] 邹喻萍,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001
- [4] 焦健,田波生,孙学刚. 甘肃文县珙桐群落的区系组成结构特征[J]. 甘肃农业大学学报,1998,33(1):57~61

- [5] Doyle J J , Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. *Phytochem Bull* ,1987 ,19 :11 ~ 15
- [6] Yeh F C , Yang R. POPGENE v 1. 31. 1999. University of Albert and Center for International Research [EB/ OL]. Download from <http://www.ualberta.ca/>
- [7] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics* ,1978 ,89 :583 ~ 590
- [8] 葛颂. 同功酶与林木群体遗传变异研究[J]. *南京林业大学学报* ,1988 ,12(1) :68 ~ 77
- [9] 李建民,周志春,吴开云,等. RAPD 标记研究马褂木地理种群的遗传分化[J]. *林业科学* ,2002 ,38(4) :61 ~ 66
- [10] 汪小全,邹喻萍,张大明. 松科系统发育的分子生物学证据[J]. *植物分类学报* ,1996 ,35(2) :97 ~ 106

Study on Genetic Differentiation for Geographic Population of *Davidia involucrate* by RAPD Marker

SONG Cong-wen^{1,2}, BAO Mar-zhu¹

(1. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China;

2. Hubei Academy of Forestry, Wuhan 430079, Hubei, China)

Abstract: *Davidia involucrate* genetic diversity of 5 populations in distribution regions was analyzed by RAPD marker. It was found that *D. involucrate* possessed rich genetic diversity, however, the genetic differentiation was enormous among the populations, 26% genetic variation existed among the populations due to small population effect and shortage of effective gene flow. By the use of UPGMA cluster analysis with Nei's genetic distance, *D. involucrate* could be soundly divided into two provenance plots of southeast and northwest, which would provide theory references for conservation and study on the development and application of germ plasm resource from *D. involucrate*.

Key words: *Davidia involucrate*; RAPD; geographic population; genetic differentiation