

乐昌含笑种群遗传多样性的研究

姜景民, 滕花景, 袁金玲, 栾启福, 谭梓峰

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 基于随机扩增多态 DNA(RAPD) 方法分析了珍稀木兰科植物乐昌含笑 6 个种群的遗传多样性及分化程度。19 条随机引物扩增出 111 个可分析位点, 多态位点百分比为 81.98%, 经 POPGENE 分析发现, 乐昌含笑的 Nei's 基因多样性(H_e) 为 0.325 5, Shannon 表型指数(I) 为 0.475 1, 与其它植物比较具有较高水平的遗传多样性。6 个乐昌含笑群体间基因分化系数(Gst) 值为 0.222 6, 群体内的遗传变异大于群体间的遗传变异。按照遗传距离将乐昌含笑 6 个群体划分为两类: 第 1 类有广西三江、湖南宜章、湖南双牌和湖南资兴的群体, 第 2 类包括江西官山和湖南醴陵的群体; 研究表明: 第 2 类种群的遗传多样性指数高于第 1 类种群的遗传多样性指数。

关键词: 乐昌含笑; RAPD; 遗传多样性; 群体分化

中图分类号: S718.46 文献标识码: A

Genetic Diversity of *Michelia chapensis* Dandy Populations

JIANG Jing-min, TENG Hua-jing, YUAN Jin-ling, LUAN Qi-fu, TAN Zi-feng

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: *Michelia chapensis*, belonging to *Michelia* genus in the family Magnoliaceae, is a elite species for timber production and for landscaping. In this paper, the genetic diversity were investigated using RAPD technique. The total DNA were extracted following a modification of CTAB method with some adjustments. A total of 144 individuals representing 6 natural population of *M. chapensis* were surveyed using 19 RAPD primers. At species level, the percentage of polymorphic bands was 81.98%, Nei's gene diversity was 0.325 5 and Shannon index was 0.475 1. AMOVA showed that 29.96% of the genetic diversity resulted from differentiation among populations. The coefficient of gene differentiation(Gst) generated by POPGENE32 was 0.222 6. The 6 natural populations of *M. chapensis* might be divided into 2 groups used UPGMA cluster system, and the genetic diversity of second group was higher than that of the first.

Key words: *Michelia chapensis*; RAPD; genetic diversity; population differentiation

乐昌含笑(*Michelia chapensis* Dandy), 木兰科(Magnoliaceae)含笑属(*Michelia* L.)植物, 自然分布于我国中亚热带偏南地区。由于原始林受人为砍伐的影响, 现呈间断零散分布, 水平分布东起福建武夷山, 西至贵州黔东南山区, 南至广东怀集, 北达湖南慈利, 包括江西、湖南、广东、广西、贵州、福建六省,

是南方常绿阔叶林的主要组成树种之一^[1]。自 20 世纪 90 年代中期乐昌含笑被作为优良绿化树种推出后, 在华东地区得到广泛研究利用, 很快就攻克了其引种育苗, 嫁接繁殖等方面的技术, 但是, 由于乐昌含笑开发利用前期被无节制地采种和砍伐, 野生资源遭到了严重的破坏, 遗传多样性受到严峻考验。

收稿日期: 2004-07-01

基金项目: 科技部基础项目“亚热带珍稀树种种质资源收集、保存及编目”(2002DEA1000203) 课题和浙江省林木良种技术支撑项目“浙江省阔叶绿化树种选育和快繁技术研究”

作者简介: 姜景民(1963—), 男, 河南长葛人, 研究员, 硕士生导师。

随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术由于其简便快捷、多态检出率高、不用放射性同位素等特点, 已被广泛应用于群体遗传结构分析、基因定位、遗传图谱构建、品种鉴别等领域。本研究利用 RAPD 技术研究了乐昌含笑群体遗传多样性与遗传分化程度, 探讨了其群体遗传结构, 试图为乐昌含笑资源保护和遗传改良提供科学依据。

表 1 采样群体生境的基本情况

群体编号	地点	地理位置	群体大小/株	样本大小/株	生境特点
Sj	广西三江	109°27' E 25°43' N	约 80	30	散生, 沟谷次生林
Jx	江西官山	114°36' E 28°25' N	> 200	30	沟谷, 阔叶林
Ll	湖南醴陵	113°27' E 27°40' N	约 250	35	天然纯林
Hn	湖南双牌	111°35' E 25°44' N	14	12	混生林, 深山沟谷
Yz	湖南宜章	113°16' E 25°20' N	200	22	散生, 深山沟谷
Zx	湖南资兴	113°36' E 25°50' N	80	15	散生, 深山沟谷

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 用改良的 CTAB 法^[2] 提取 DNA, 利用日本岛津 UV-2401PC 紫外分光光度计测光吸收, 其中采用 OD_{260} 值 (260 nm 处光吸收值) 代表提取的 DNA 的浓度, 用 OD_{260}/OD_{280} 的比值表示提取的 DNA 纯度, 利用 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳检测全 DNA 的质量。

1.2.2 PCR 扩增程序的构建 根据 Taguchi 法优化的结果^[3], 确定 25 μL 反应体系如下: 10 倍 PCR 反应缓冲液 2.5 μL , 引物 (上海生工, 10 bp 随机引物) $0.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTPs (上海生工) $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 模板 20 ng, taq 酶 (上海生工) 1.17 U, 扩增在 PCR 扩增仪 PE9600 上进行。扩增的热循环参数设定如下: 94 °C 预变性 5 min, 随后进入 3 步法 PCR 循环 (循环包括 94 °C 变性 45 s, 37 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s), 这 3 步循环 40 次后跳出循环再在 72 °C 处延伸 10 min, 扩增过程结束。设定仪器自动转入 4 °C 以保存扩增产物等待操作人员检测。

1.2.3 引物筛选 选择经预备实验 PCR 扩增良好的来自不同群体的 6 个 DNA 模板, 对 72 条 RAPD 随机引物 (上海生工, 引物编号 S₁₀~S₄₅, S₁₄₀~S₁₇₅) 进行扩增、筛选, 最后筛选出稳定性好、多态性强的引物对所有群体的 DNA 模板进行 PCR 扩增和电泳分析。

1.2.4 数据处理与统计分析 扩增产物用 $15 \text{ g} \cdot$

1 材料与方 法

1.1 实验材料

2002 年 7 月采集了广西、湖南、江西的野生乐昌含笑 6 个群体共 144 个个体, 分单株取叶片, 硅胶快速干燥。采样群体的地理位置、样本大小、生境海拔见表 1。

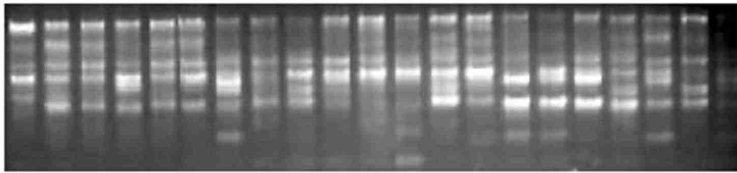
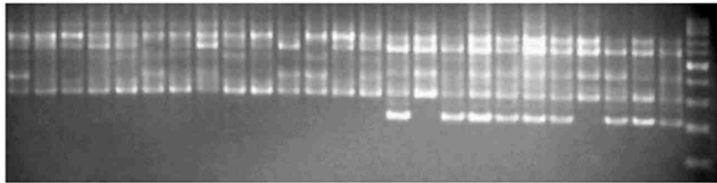
L^{-1} 的琼脂糖凝胶在 0.5 倍 TBE 缓冲液中电泳分离, 200 bp ladder DNA (购自上海华美) 为分子量标准, 溴化乙锭染色后用 FR-960 紫外可见分析成像系统观察拍照。每个样品的扩增电泳谱带按有 (1) 和无 (0) 记录, 构成原始数据矩阵, 用 POPGEN32 软件 (版本号 1.31, 由加拿大 Alberta 大学 Francis C. Yeh 博士及其实验室于 1997 年开发, 官方发布于以下网站: <http://www.ualberta.ca/~fyeh>) 和 WINAMOVA 软件 (版本号 1.04, 由瑞士日内瓦大学的 Laurent Excoffier 博士 1992 年编写, 官方发布于:

<http://anthropologie.unige.ch>)^[4] 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 乐昌含笑 RAPD 扩增片段的多态性

对 72 个随机引物进行筛选, 从中选出 19 个扩增谱带清晰且多态性丰富的引物对 6 个乐昌含笑群体 144 个个体进行扩增反应。本文不同引物扩出的带从 3 个到 7 个不等, 19 个引物共扩增出 111 条 DNA 片段, 其中多态性片段有 91 条, 占总条带数的 81.98%, 平均每条引物扩增出的多态条带 4.8 条, 表明乐昌含笑种群具有较丰富的遗传变异 (见图 1 和图 2, 由于篇幅有限, 所以不一一列出所有的模板扩增的结果, 仅列举一二)。

图 1 引物 S_{167} 对部分模板的扩增模式图(示同一引物对不同个体扩增得到的片段从 3 条到 7 条不等)图 2 引物 S_{11} 对部分模板的扩增模式图

2.2 乐昌含笑不同种群的遗传多样性

2.2.1 乐昌含笑群体遗传变异的分布 为了衡量群体间和群体内遗传变异的程度,利用 AMOVA 软件对 6 个乐昌含笑群体进行 RAPD 遗传变异分布的分析。结果(表 2)发现:在乐昌含笑群体间与群体内存在丰富的变异,其中群体间变异占 29.96%,群体内变异占 70.04%,差异显著性水平 0.001。乐昌含笑的 Q_{st} 值是 0.3。

表 2 乐昌含笑 6 个种群 144 个个体
基于 RAPD 的 AMOVA 分析

变异来源	自由度	平方和	均方	$Q_{st}^{(1)}$	均方比(方差分量)
群体间	5	797.34	159.468	0.300	6.19(29.96%)
群体内	138	1997.46	14.470		14.47(70.04%)
总计	143	2794.80	19.540		

注:1) Q_{st} ,在 AMOVA 中基因分化系数的表示符号,和下文 POPGENE32 中的 G_{st} 表示的意义相同。两个软件在保留小数点位数以及统计分析过程中不一样,导致有 0.07 左右的差异,为了表示区别,所以没有共用一个符号。

2.2.2 乐昌含笑种群的遗传多样性 多样性指数通常用于表示种群内和种群间的遗传变异程度,基因多样度和 Shannon 信息指数是衡量生物遗传多样性的 2 个重要指标。基于 19 条 RAPD 引物所扩增出

的多态条带,用 POPGENE32 在假设遗传平衡时,利用 POPGENE32 软件计算的有效等位基因数(N_e)、 $Nei's$ 基因多样性(H_e)和 Shannon 表型指数(I)等指标列于表 3 中。乐昌含笑总群体基因多样性和 Shannon 多样性指数分别为 0.318 7 和 0.475 1,群体间基因分化系数(G_{st})值为 0.222 6,说明不同种群的遗传变异有 22% 左右存在于群体间,78% 左右的变异存在于群体内,比 AMOVA 所得的值略低(见表 2 附注)。

表 3 中 Shannon 遗传多样性分析结果显示,在 6 个种群中,Shannon 表型指数以湖南资兴种群最低,湖南醴陵种群最高。6 个种群的 Shannon 表型指数依次为:湖南醴陵种群(0.391 5) > 江西官山种群(0.386 1) > 广西三江种群(0.377 6) > 湖南宜章种群(0.361 9) > 湖南双牌种群(0.356 6) > 湖南资兴种群(0.326 0)。 $Nei's$ 基因多样性研究结果显示:以湖南资兴种群最低,湖南醴陵种群最高。6 个种群的遗传多样性依次为:湖南醴陵种群(0.267 3) > 江西官山种群(0.260 8) > 广西三江种群(0.255 4) > 湖南宜章种群(0.244 7) > 湖南双牌种群(0.240 5) > 湖南资兴种群(0.217 8),表现出与 Shannon 表型指数相同的趋势。

表 3 乐昌含笑种群的遗传多样性与分化

种群	有效等位基因 (N_e)	$Nei's$ 基因多样性 (H_e)	Shannon 表型指数 (I)	总群体基因多 样性(H_t)	群体内基因多 样性(H_s)	群体间基因分 化(G_{st})
广西三江	1.449 6	0.255 4	0.377 6			
江西官山	1.451 4	0.260 8	0.386 1			
湖南醴陵	1.476 4	0.267 3	0.391 5			
湖南双牌	1.420 1	0.240 5	0.356 6			
湖南宜章	1.426 0	0.244 7	0.361 9			
湖南资兴	1.371 2	0.217 8	0.326 0			
总体分析	1.577 6	0.325 5	0.475 1	0.318 7	0.247 8	0.222 6
标准差	0.360 1	0.182 6	0.253 0	0.032 6	0.024 4	

2.3 乐昌含笑种群间遗传距离和聚类树状图

基因分化系数只能对群体分化的程度作出评价,却不能判定群体间相互关系的远近,而遗传相似系数和遗传距离的度量则可以说明每个群体间彼此

关系的远近。为了确定乐昌含笑 6 个群体间的遗传关系,需计算出各群体间的遗传相似系数和遗传距离,计算结果见表 4。由表 4 可见,群体间遗传相似系数最高为 0.983 6,最低为 0.824 3。

表 4 乐昌含笑 6 个种群 Nei's 非偏差遗传距离和遗传相似系数

种群	广西三江	江西官山	湖南醴陵	湖南双牌	湖南宜章	湖南资兴
广西三江	-	0.845 5	0.845 4	0.960 0	0.983 6	0.942 3
江西官山	0.167 8	-	0.930 3	0.830 4	0.831 4	0.849 8
湖南醴陵	0.168 0	0.072 2	-	0.848 9	0.824 3	0.834 3
湖南双牌	0.040 8	0.185 9	0.163 8	-	0.920 2	0.928 5
湖南宜章	0.016 5	0.184 6	0.193 3	0.083 2	-	0.926 1
湖南资兴	0.059 5	0.162 8	0.181 2	0.074 2	0.076 7	-

注: 右上角为遗传相似系数, 左下角为遗传距离。

遗传距离表示 2 个群体间的遗传差异, 一般用单个数值来表示^[5], 乐昌含笑各群体的遗传距离: 湖南宜章和广西三江的距离最近(0.016 5), 湖南宜章和湖南醴陵最远(0.193 3)。一般情况下植物群体遗传变异性的分布情形和该物种的地理分布情形、生态特征有关^[6], 但也存在不同的观点。一种研究结果认为遗传距离与空间距离之间的相关性很大^[7-10], 但也有学者的研究结果认为遗传距离与空间距离之间并无明显的内在关系^[11-13]。本研究发现遗传距离的大小和它们的纬度距离的远近存在正相关, 随着纬度距离增大, 群体间遗传距离也有增大的趋势, 但没有表现出数学上严格的正相关。根据遗传距离利用 UPGMA 聚类法得出了 6 个乐昌含笑群体的亲缘关系树状图(图 3)。由图 3 可以看出, 利用 RAPD 标记可以较好地将 6 个产地乐昌含笑群体划分为 2 个大类。第 1 类主要包括广西三江、湖南宜章、湖南双牌和湖南资兴的群体, 第 2 类包括江西官山和湖南醴陵的群体。分类结果与群体所居的纬度位置是比较一致的, 其中第 1 类群都是在 25°N 附近(广西三江(25°43'N)、湖南宜章(25°20'N)、湖南双牌(25°44'N)和湖南资兴(25°50'N)), 只跨越了半个纬度(30'); 第 2 类群是在 27°N 附近(湖南醴陵(27°40'N)和江西官山(28°25'N)), 纬度跨越 45'。聚类的结果和经度没有多少关系, 从经度上看是交叉分布于 109°27'E 到 114°30'E, 这种聚类结果从一个侧面反映了植物种群的变异主要受与纬度相关的温度和光照的影响, 而在一个小的范围内与经度关系不大, 经度造成的气候差别对遗传变异只有微弱的影响。

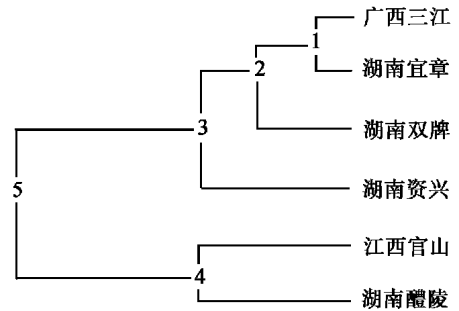


图 3 乐昌含笑 6 个种群 UPGMA 聚类法得出的树状图

3 讨 论

遗传多样性是物种长期进化的结果, 是种群生存和发展的前提。本研究结果揭示乐昌含笑具有较高的遗传多样性, 平均 Shannon 指数为 0.475 1, 多态位点频率高达 81.98%, 种群间的基因分化系数为 22.26%。Busse^[14] 曾对 35 个物种的 RAPD 研究结果进行了总结, 发现 29 个远交物种的群体间变异在总的遗传变异中平均占 19.3% ($G_{st} = 0.193$), 而 6 个近交物种的平均 G_{st} 值为 0.625, 显然乐昌含笑的基因分化系数远低于近交物种的水平, 但却略高于远交物种的平均值。按遗传距离将乐昌含笑 6 个群体划分为 2 类: 第 1 类主要包括广西三江、湖南宜章、湖南双牌和湖南资兴的群体, 在本研究的乐昌含笑分布区中属于较低纬度群体(25°N 到 26°N 的半个纬度的狭窄范围内), 第 2 类包括江西官山和湖南醴陵的群体, 属于本研究的乐昌含笑分布区中较高纬度群体(27°N 左右大约 3/4 个纬度范围内)。第 2 类种群的遗传多样性指数高于第 1 类种群的遗传多样性指数, 可能是因为所跨越的纬度范围要比第 1 类广, 也可能是因为第 2 类种群的江西官山于 1981 年

即设立了省级自然保护区, 所以其物种保存完好; 而湖南醴陵市各级政府和林业部门都采取了一系列措施对自然资源予以保护, 其野生物种保护也取得较好的效果。总之, 由于第2类种群受到的人为破坏比较少, 种群规模比较大, 存在着丰富的基因交流, 所以其遗传多样性水平较高, 而在野外调查过程中, 由于人为的砍树采种, 无节制伐木用材等原因, 作者发现广西三江, 湖南双牌及湖南资兴等地的乐昌含笑已遭到严重破坏, 致使其种群在急剧减少, 近于濒危, 所以第1类种群遗传多样性水平比较低。

遗传多样性指数是反映种质材料遗传多样性的有效指标, 遗传多样性指数高的地区说明种质类型较多, 遗传差异较大, 在品种改良中有较大的遗传潜力。因此, 遗传多样性的研究为有效地发掘和利用野生乐昌含笑丰富的基因资源提供了理论依据。本研究结果表明: 乐昌含笑群体内的遗传变异大于群体间的遗传变异, 所以在进行种质收集或种源试验时, 可以适当地在群体内加大取样单株的数量, 以增加遗传变异的来源。

参考文献:

- [1] 郑万钧. 中国树木志(第一卷)[M]. 北京: 中国林业出版社, 1983: 479~494
- [2] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytoche Bull*, 1987, 19: 11~15
- [3] 滕花景, 栾启福, 谭梓峰, 等. 用Taguchi法优化乐昌含笑 RAPD 扩

增体系[J]. *林业科学研究*, 2004, 17(专刊): 64~70

- [4] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Data[J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 479~491.
- [5] Smith C A B. A note on genetic distance[J]. *Annual Human Genetics*, 1977, 21: 254~276
- [6] Loveless M D, Hamrick J L H. Ecological determinants of genetic structure in plant populations[J]. *Annual Review Ecology System*, 1984, 15: 65~95
- [7] Kiang Y T, Chiang Y C. Comparing differentiation of wilds Bean (*Glycinesja siebard* Zucc) populations on isozymes and quantitative traits[J]. *Botanical Bulletin Academic Sinica*, 1990, 31: 129~142
- [8] Alpert P, Lumaret R, Giusto F D. Population structure inferred from allozyme analysis in the clonal herb *fragaria obibersis* (Rosaceae) [J]. *American Botany*, 1993, 80(9): 1002~1006
- [9] 郑向忠, 洪伟, 俞海菁. 黑果蝇(*D. virilis*) 自然群体遗传多态研究[J]. *遗传学报*, 1999, 26(3): 198~202
- [10] 郎萍, 黄宏文. 栗属中国特有种居群的遗传多样性及地域差异[J]. *植物学报*, 1999, 41(6): 651~657
- [11] 黄启强, 王莲辉. 马尾松天然群体同工酶遗传变异[J]. *遗传学报*, 1995, 22(2): 142~151
- [12] 李军, 陶芸, 郑师章, 等. 同工酶水平上野生大豆种群内分化的研究[J]. *植物学报*, 1995, 37(9): 669~676
- [13] 黎中宝, 林鹏. 不同纬度地区桐花树种群的遗传多样性研究[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2001, 6(1): 39~45
- [14] Bussell J D. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma patraea* (Lobeliaceae) [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 775~789