

## 云南河谷构树的遗传多样性研究

廖声熙<sup>1</sup>, 崔凯<sup>1\*</sup>, 周敏<sup>2</sup>, 何承忠<sup>3</sup>, 杨文云<sup>1</sup>, 李昆<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南昆明 650224; 2. 云南农业职业技术学院, 云南昆明 650212;  
3. 西南林业大学林学院, 云南昆明 650224)

**摘要:**以云南省境内金沙江、元江、红河和怒江流域自然分布的构树为试材,采用 AFLP 分子标记技术对 90 份构树种质资源进行了遗传多样性分析研究。结果表明:筛选出的 7 对引物组合共扩增获得 786 条清晰可辨的条带,其中,多态性带 632 条,多态性条带百分率达 80.4%,平均每对引物组合检测出 90.3 个多态位点。分布于 4 条水系流域的构树居群间,金沙江流域构树居群的遗传多样性水平最高,Nei's 基因多样性指数为 0.145 5,而元江流域构树居群的遗传多样性水平最低,Nei's 基因多样性指数为 0.112 9。4 个构树居群间的遗传分化系数为 0.038 6,表明构树的遗传变异主要存在于居群内不同个体之间。在遗传距离为 0.003 时,4 个构树居群可分为 2 组,第 1 组由金沙江流域的构树居群构成,第 2 组包含分布于红河、怒江和元江流域的 3 个构树居群。

**关键词:**构树;天然林;遗传多样性;AFLP 标记

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

### Analysis on Genetic Diversity of *Broussonetia papyrifera* Distributed in River Basin of Yunnan Province

LIAO Sheng-xi<sup>1</sup>, CUI Kai<sup>1</sup>, ZHOU Min<sup>2</sup>, HE Cheng-zhong<sup>3</sup>, YANG Wen-yun<sup>1</sup>, LI Kun<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Yunnan Vocational and Technical College of Agriculture, Kunming 650212, Yunnan, China; 3. Forestry College, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** Ninety *Broussonetia papyrifera* samples were collected from four river basins in Yunnan province and used as materials, and AFLP markers were employed to analyze their genetic diversity. The results showed that total 786 unambiguous bands were revealed from selected 7 primer combinations, of which 632 bands were polymorphic, and the ratio of polymorphic bands was 80.4%. An average of 90.3 polymorphic bands was detected from each primer combination on average. Among four *B. papyrifera* populations, the population of Jinsha-river Basin held the highest level of genetic diversity, the Nei's gene diversity being 0.145 5, while the population of Yuanjiang-river Basin held the lowest level of genetic diversity, the Nei's gene diversity being 0.112 9. The genetic differentiation coefficient was 0.038 6, which indicated that the genetic variation of individuals within population being the main sources of genetic diversity in *B. papyrifera*. The four populations of *B. papyrifera* could be divided into two groups with the genetic distance threshold 0.003. The group I consisted of only the population of Jinsha-river Basin, and group II included the other three populations of *B. papyrifera*. This research results could provide some references for the protection and utilization of *B. papyrifera* resources.

**Key words:** *Broussonetia papyrifera*; natural forest; genetic diversity; AFLP markers

收稿日期:2013-04-22

基金项目:国家自然科学基金“西南干热河谷野生构树种质评价与分子鉴定研究(30972383)”;中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(RIRICAF201007M)

作者简介:廖声熙(1971—),男,贵州黎平人,副研究员,主要从事森林培育、森林经营方面研究。

\* 通讯作者:E-mail:cafcuikai@163.com.

构树 (*Broussonetia papyrifera* L.) 为桑科 (Moraceae) 直立落叶乔木, 原产于中国和日本, 现广泛分布于中国、马来半岛、日本和太平洋诸岛<sup>[1]</sup>。构树分布范围广, 生长快, 培育周期短, 树皮纤维含量高。构树经济价值极高, 构树果可生食和酿酒, 有补肾、壮筋骨、健胃消肿之功效。构树皮、白色汁液均可入药。构树叶是优良的蛋白质饲料, 亦可供保健食品添加剂之用。树皮是优质造纸及纺织原料, 纤维洁白柔韧, 纤维细长, 强度大, 是生产特种纸的好原料, 是一种具有较大开发利用潜力的重要经济树种<sup>[2]</sup>。近年由于社会经济的迅猛发展, 我国木材资源短缺, 人均纸张消耗量的增加, 使天然造纸原料价格猛涨, 也使构树皮特种纤维纸具有广阔的市场前景, 它丰富的树皮资源也是解决我国纸用长纤维不足的捷径。

构树在云南省金沙江流域、红河流域、怒江等流域的山坡、山谷或平坝村社旁均有分布。金沙江、怒江、红河是流经云南省境的主要水系, 其独特的地形地貌和干热、干暖河谷气候类型成为生物多样性最为丰富的地区之一, 也是西南构树树皮的主要产区。遗传多样性水平和遗传结构的研究是良种选育的基础。前人已通过一些分子标记手段对构树开展研究, 如基于 SRAP 标记对不同种源构树材料的分析<sup>[3]</sup>、利用 AFLP

别<sup>[4]</sup>、采用核糖体中的非编码转录间隔序列对构树的地理变异研究<sup>[5]</sup>等。本研究采用 AFLP 分子标记技术, 以金沙江、怒江、元江和红河流域内采集的天然构树林为试材, 从 DNA 水平检测不同流域内构树遗传多样性水平, 以期为构树种质资源的收集与保护、杂交育种亲本选配、人工选择育种等提供前期研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在各水系两岸, 纵向延伸 1 000 m 的区域内, 依照随机取样的原则采取试验样本, 各样株在水系流向间隔约 2 000 m, 在纵向延伸方向间隔约 500 m。共采集金沙江水系构树样株 30 株, 怒江水系 20 株, 元江水系 20 株, 红河水系 20 株 (表 1 和图 1), 共计 90 株用于不同水系构树遗传多样性分析。采集嫩叶, 用硅胶干燥, 带回实验室备用。

表 1 供试样品的地理坐标

采样地点	地理位置	采样数/株	海拔分布/m
金沙江河谷	26°20' N 100°22' E	30	2 113 ~ 2 367
怒江河谷	26°27' N 99°18' E	20	2 662 ~ 2 956
元江河谷	23°50' N 102°07' E	20	657 ~ 865
红河河谷	23°23' N 102°22' E	20	502 ~ 621

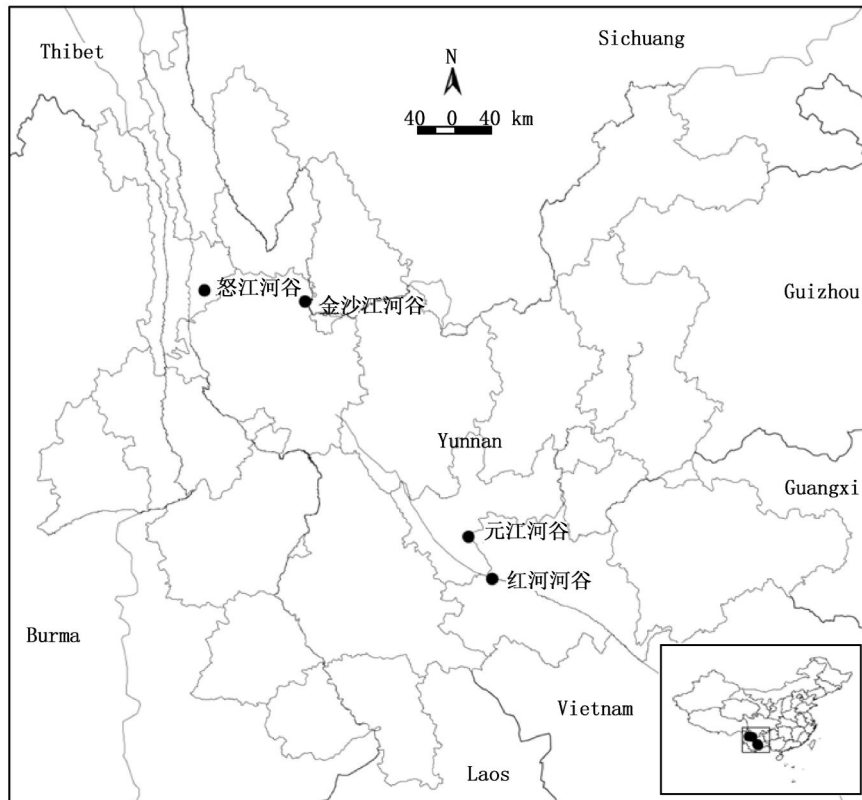


图 1 不同水系采样示意图

## 1.2 方法

1.2.1 分析样株基因组 DNA 的制备 采用 SDS 法依照标准酚/氯仿方法的程序与步骤<sup>[6]</sup>,提取分析材料的基因组总 DNA,在 0.8% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测 DNA 质量,并用紫外分光光度计(UV-2201)测定其浓度,最后稀释到  $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,冻存于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱备用。

1.2.2 AFLP 分析 AFLP 分析的实验流程与方法参照 Vos 等<sup>[7]</sup>的方法进行。仅针对构树材料,对 AFLP 反应体系进行了优化。采用内切酶 *EcoR* I (Biolab) 和 *Mse* I (Biolab) 组合对分析材料的基因组 DNA 进行限制性酶切,酶切与连接同步完成。预扩增反应选用引物组合 E00/M00,选择性扩增采用 E + 3/M + 3 引物组合方式。PCR 扩增反应在 PTC-100™ Thermal PCR 仪上进行,所用接头与引物均由上海生工合成,Taq DNA 聚合酶与 dNTP 购于上海生工。选择性扩增产物经过  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 min 后,用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳采用东方君意公司生产的测序电泳槽,在 90 W 恒功率的条件下电泳约 2 h。电泳结束后采用银染检测方法进行 AFLP 指纹显色反应<sup>[8]</sup>。

1.2.3 数据统计与分析 AFLP 属于显性标记,电泳图谱的每一条带可以看作一个位点,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。因此,按照电泳图谱中同一位置上 AFLP 条带

的有无进行统计,有带记为“1”,无带记为“0”,形成 0/1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE 1.31 软件在假定居群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下,计算多态位点百分率(PPL)、观测等位基因数( $A_o$ )、有效等位基因数( $A_e$ )、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)以及不同水系构树居群间的 Nei's 遗传距离<sup>[9]</sup>,采用 UPGMA 方法进行聚类分析。POPGENE 1.31 软件的输入文件由 DCFA 1.1 软件制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同引物组合对 4 条水系构树居群的扩增结果

从 48 对引物组合中,筛选出多态性较高、条带清晰且分布较均匀的 7 对 AFLP 引物组合用于构树 4 个居群共 90 个样本的选择性扩增分析。由表 2 可知:7 对 AFLP 引物组合共检测到有效条带 786 条,其中,多态性条带 632 条,多态带百分率为 80.4%。平均每对引物组合扩增出 112.3 条带,平均多态性带为 90.3 条。有效条带长度主要分布在 50 ~ 450 bp 内,而 110 ~ 400 bp 内多态性片段较多。7 对引物组合中,E64/M54 引物组合检测效率最高,其产生位点的多态性条带比率达到 86.4%,而 E40/M34 引物组合扩增出的条带数最多,但多态性条带比率最低,其多态性条带比率为 75.9%。

表 2 不同引物扩增位点数及多态位点比率

引物组合	统计带长范围/bp	总位点数	总多态位点数	总多态位点比率/%
E38/M65	70 ~ 400	118	97	82.2
E40/M34	50 ~ 450	141	107	75.9
E48/M34	80 ~ 300	112	89	79.5
E63/M36	90 ~ 400	82	66	80.5
E63/M41	100 ~ 400	128	105	82.0
E64/M54	90 ~ 400	110	95	86.4
E66/M64	80 ~ 450	95	73	76.8
平均		112.3	90.3	80.5
总计		786	632	80.4

### 2.2 4 条水系构树居群的遗传多样性

对 4 条水系构树居群 AFLP 标记的统计分析结果(表 3)显示:在物种水平上,构树 90 个样本检测到多态性条带百分率为 79.26%,每位点观测等位基因数为 1.792 6,有效等位基因数为 1.178 6,基因多样性指数为 0.132 8,Shannon 信息指数为 0.232 6。在居群水平上,不同居群多态性条带百

分率为 60.56% ~ 71.76%,平均多态位点百分率为 65.05%;观测等位基因数变幅为 1.605 6 ~ 1.717 6,平均为 1.650 5;有效等位基因数变异范围为 1.159 3 ~ 1.206 3,平均为 1.175 9;基因多样性指数为 0.112 9 ~ 0.145 5,平均为 0.125 3;Shannon 信息指数的变幅为 0.192 5 ~ 0.245 1,平均为 0.213 2。以各居群的基因多样性指数从高到低排

序,依次为金沙江 > 怒江 > 红河 > 元江,其他遗传多样性参数的变化趋势与基因多样性指数一致。由此可见,在 4 条水系流域的构树居群之间,金沙江居群

遗传多样性水平最高,其次为怒江居群和红河居群,而元江居群的遗传多样性水平最低。

表 3 不同构树居群的遗传多样性

居群	多态位点比率/%	观测等位基因数	有效等位基因数	基因多样性指数	Shannon 信息指数
金沙江	71.76	1.717 6	1.206 3	0.145 5	0.245 1
怒江	64.38	1.643 8	1.170 6	0.123 9	0.212 2
元江	60.56	1.605 6	1.159 3	0.112 9	0.192 5
红河	63.49	1.634 9	1.167 2	0.118 9	0.203 0
居群水平	65.05	1.650 5	1.175 9	0.125 3	0.213 2
物种水平	79.26	1.792 6	1.178 6	0.132 8	0.232 6

2.3 4 条水系构树居群的遗传分化

构树种内总基因多样性( $H_t$ )为 0.130 3,居群内基因多样性( $H_s$ )为 0.125 3,基因分化系数( $G_{st}$ )为 0.038 6,基因流为 12.455 7。由此可知:4 条水系流域内的构树居群之间存在着较高的基因交流,有效防止了因地理隔离、遗传漂变等引起的居群间遗传分化,结果导致仅有 3.86% 的遗传变异存在于居群间,而居群内不同个体之间的遗传变异占 96.14%。因此,4 条水系流域内构树的遗传变异主要来源于居群内不同个体的遗传差异,与绝大多数木本植物的遗传变异规律相一致。

2.4 4 条水系构树居群的聚类分析

由表 4 可知:4 条水系流域内构树居群间的遗传距离为 0.005 5 ~ 0.009 8,其平均值为 0.007 6,其中,元江居群与怒江居群和红河居群之间的遗传距离最小,均为 0.005 5,表明它们之间的亲缘关系很近;而元江居群与金沙江居群之间的遗传距离最大,为 0.009 8,表明其亲缘关系最远。从聚类分析结果(图 2)可以看出:构树不同居群之间存在一定的遗传差异,在阈值为 0.003 时可将 4 个居群大体分为 2 组,第 1 组由金沙江构树居群独自构成,而第 2 组包含了怒江、红河和元江 3 个构树居群。

表 4 不同构树居群间的遗传距离

居群	金沙江	怒江	元江	红河
金沙江	0			
怒江	0.009 6	0		
元江	0.009 8	0.005 5	0	
红河	0.009 3	0.006 2	0.005 5	0

3 讨论

经 Mantel 检验指出,4 个水系样品的地理距离与遗传距离没有显著的相关关系( $r = 0.172 8, P =$

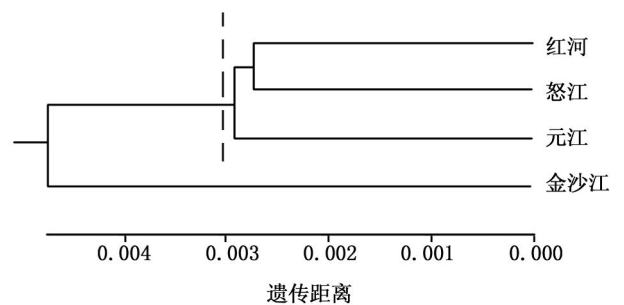


图 2 不同构树居群 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类

0.064; 数据略),这表明地理位置不是造成各水系构树遗传分化的主要原因。与低纬度地区相比,在高纬度地区特殊的环境下会引起一些基因突变,而大多数突变能被遗传的<sup>[10]</sup>,本研究中,金沙江和怒江河谷的海拔较高,其构树居群的多态位点比率相应较高(71.76%和 64.38%),元江和红河河谷的海拔相对较低,其构树居群的多态位点比率相应较低(60.56%和 63.49%),这表明海拔可能在一定程度上影响了构树的遗传分化。由于干热河谷的焚风效应和封闭的地形地势,这些流域形成了独特的干热河谷气候,干旱、强光和高温等多重胁迫并存,植物经过长期的进化,形成了复杂多样的适应机制。本研究通过对云南不同水系构树 90 个样本的 AFLP 分析得到物种水平的多态性条带百分率为 79.26%,每位点观测等位基因数为 1.792 6,有效等位基因数为 1.178 6,基因多样性指数为 0.132 8,Shannon 信息指数为 0.232 6,均反映出构树在此环境下表现出较高的遗传多样性,是构树与恶劣的生存环境条件长期适应的结果,当地构树也表现出树形高大直立,生长迅速,树皮花纹变化多样,树皮纤维含量高的优良特点。由此可见,本研究所采集的试材分布区域较为广泛,地形破碎多样,环境条件复杂多变,选择压较高,使构树表现出丰富的遗传多样

性。元江和红河河谷构树居群的遗传多样性较低,通过实地观察,这可能与当地频繁的人为干扰有关,所以应加强对这两个地点构树资源的保护。

重视与长纤维树种有关树皮纤维遗传变异规律的研究,有助于特种纤维材速生、高纤维素含量等品种的选育。目前已有较多研究揭示了木材性状的基因型与立地等环境互作<sup>[11-12]</sup>,如 Pot 等<sup>[13]</sup>通过对海岸松木材密度、 $\alpha$  纤维素和木质素含量遗传力和遗传效应研究,认为应在已经生长改良的居群中开展优良材性居群的选择。Poke 等<sup>[14]</sup>的研究表明,9 个蓝桉地域种的木质素含量差异显著,具有较大的狭义遗传力,可开展优良性状选择。生境破碎化是指生物物种、群落的生存繁衍起干扰、抑制作用的因素分割、压缩生境的过程。在 4 条水系流域中,金沙江流域干热条件最为恶劣,其次为怒江流域,以构树各居群的基因多样性指数从高到低排序,依次为金沙江 > 怒江 > 红河 > 元江。其他遗传多样性参数的变化趋势与基因多样性指数一致,这与构树生境破碎化、生态环境条件恶劣程度有较高的相关性,由此可根据研究的结果结合生产实践,研究较少涉及树皮纤维特性与环境互作效应问题,重点在金沙江流域开展构树的优良无性系和品种选择,促进特种纤维林的后续发展。

基因流是一个集合名词,它包括致使基因从一个居群到另一个居群或从一个亚居群到另一个亚居群成功运动的所有机制<sup>[15]</sup>。基因流的产生途径具体包括配子的运动,整个居群的灭绝与再集群,核外 DNA 运动等。在植物中,更强调花粉和种子的散播引起的基因流。基因的相互交流引起居群内遗传变异量的增加,减少了居群间的分化,这与遗传漂变的作用是相互拮抗的<sup>[16-17]</sup>。Wright<sup>[18]</sup>指出,如果基因流值 > 1,就足以抵制居群由遗传漂变引起的遗传分化,维持遗传变异的多样性,防止近交衰退,而分化程度较低的居群间存在较高的基因交流频率。本研究中,4 条水系流域内构树居群的基因流值为 12.455 7,说明居群间存在较高度度的基因交流,防止了由遗传漂变引起的居群间的遗传分化;但 4 条水系流域内构树居群之间如何保持如此高的基因流值,有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Zerega N J C, Clement W L, Datwyler S L, et al. Biogeography and

- divergence times in the mulberry family (Moraceae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 37: 402-416
- [2] 浦同省,李 昆,廖声熙. 我国长纤维树种构树的研究现状与发展前景[J]. *现代林业科技*, 2008(24): 19-21
- [3] 刘志远,范卫红,沈世华. 构树 SRAP 分子标记[J]. *林业科学*, 2009, 45(12): 54-58
- [4] 廖声熙,何承忠,李 昆,等. 金沙江干热河谷地区构树的 AFLP 分析[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(12): 2393-2398
- [5] Seelenfreund D, Piña R, Ho K Y, et al. Molecular analysis of *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. (Magnoliophyta: Urticales) from the Pacific, based on ribosomal sequences of nuclear DNA[J]. *New Zealand Journal of Botany*, 2011, 49(3): 413-420
- [6] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4321-4325
- [7] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new concept for DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 4407-4414
- [8] Tixier M H, Sourdille P, Roder M, et al. Detection of wheat microsatellites using a non radioactive silver-nitrate staining method [J]. *Journal of Genetics and Breeding*, 1997, 51: 175-177
- [9] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590
- [10] Li J, Chen K Y, Li Bosheng. The variation of genetic diversity of *Quercus aquifolioides* in different elevations[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40(8): 761-767
- [11] McKeand S E, Eriksson G, Roberds J H. Genotype by environment interaction for index traits that combine growth and wood density in loblolly pine[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94(8): 1015-1022
- [12] Sykes R, Li B L, Isik F, et al. Genetic variation and genotype by environment interactions of juvenile wood chemical properties in *Pinus taeda* L. [J]. *Annals of forest science*, 2006, 63(8): 897-904
- [13] Pot D, Chantre G, Rozenberg P, et al. Genetic control of pulp and timber properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) [J]. *Annals of forest science*, 2002, 59(5-6): 563-575
- [14] Poke F S, Potts B M, Vaillancourt R E, et al. Genetic parameters for lignin, extractives and decay in *Eucalyptus globules* [J]. *Annals of forest science*, 2006, 63(8): 813-821
- [15] Slatkin M. Gene flow in natural populations[J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1985, 16: 393-430
- [16] Lenormand T, Guillemaud T, Bourguet D, et al. Evaluating gene flow using selected markers: a case study[J]. *Genetics*, 1998, 149: 1383-1392
- [17] Whitlock M C, David E M. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$  [J]. *Heredity*, 1999, 82: 117-125
- [18] Wright S. The genetical structure of populations[J]. *Annals of Eugenics*, 1951, 15: 323-334