

领春木的遗传多样性分析^①

王芳¹, 何平², 张益锋³

1. 西藏大学 农牧学院资环院, 西藏 林芝 860000; 2. 西南大学 生命科学院, 重庆 400715;
3. 绍兴文理学院 元培学院, 浙江 绍兴 325000

摘要: 利用 RAPD 标记对重庆 5 个县的濒危植物领春木居群作遗传多样性分析, 扩增出总多态位点百分率为 87.18%, 经 Shannon 指数和 Nei 指数估算的这 5 个居群的遗传多样性排列次序从大到小依次为城口、南川、开县、巫溪、万盛, 其大部分的遗传分化存在于居群之内, 均达到 80% 以上. 遗传矩阵和聚类分析的结果显示遗传距离的大小和地理距离的远近一致.

关键词: 领春木; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q943

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)11-0070-05

领春木 *Euptelea pleiospermum* Hook. f. et Thoms. 为领春木科 Eupteleaceae、领春木属 *Euptelea* Sieb. & Zucc. 的落叶灌木或小乔木. 领春木为国家 3 级保护植物, 本种是典型的东亚植物区系成分的特征种, 又是古老的孑遗植物, 对研究植物系统发育和植物区系都有一定的科学意义. 本文通过 RAPD 法对其遗传多样性进行研究, 探讨其种群适应及濒危机制, 为合理保护该物种提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料

分别选取了重庆市万盛(pop1)、南川(pop2)、城口(pop3)、巫溪(pop4)、开县(pop5)这 5 个具代表性分布地中领春木的幼叶^[1-2].

1.2 方法

1.2.1 用改良 CTAB 法提取领春木叶片中的总 DNA^[3], 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳(10 V/cm, 10 min)和 OD_{260/280} 比值检测, 选取模版.

1.2.2 从 S1-S100 总计 100 个寡核苷酸随机引物筛选出 11 条扩增效果较好, 重复和稳定性高的引物用于领春木遗传多样性检测.

1.2.3 领春木 RAPD 反应体系的建立和优化^[4]

(1) RAPD 主要成分用量的优化

RAPD-PCR 反应体系的 5 种主要成分 TaqDNA 聚合酶、引物、DNA 模板、Dntp、Mg²⁺ 的用量设 10 个处理梯度, 依次进行 PCR 反应. 选取最优反应体系. 所有反应体系为 25 μ L.

① 收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070080).

作者简介: 王芳(1983-), 女, 四川内江人, 讲师, 主要从事植物保护生物学研究.

通信作者: 何平, 教授, 博士生导师.

(2) 反应程序的优化

利用上面优化的各因素组合，在基本扩增程序的基础上，针对几个主要影响因素：变性时间、退火温度、延伸时间及循环次数作正交分析，找出扩增效果较稳定且完整清晰的扩增程序。

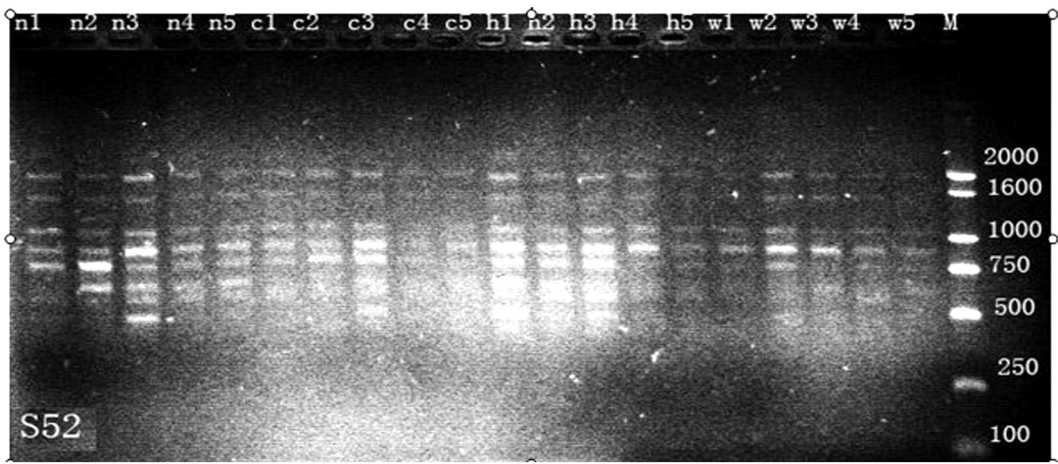
2 结果与分析

2.1 RAPD 反应体系和扩增程序的优化结果

领春木的最优 RAPD 反应 25 μ L 体系为：Dntp 0.16 mmol/L、模板 DNA50 ng、Taq DNA 聚合酶 1.25 U、 Mg^{2+} 1.5 mmol/L、引物 0.24 μ mol/L. 最佳反应程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min；94 $^{\circ}$ C 变性 60 s，36 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min；4 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 RAPD 扩增结果

10 个引物在领春木 5 个居群中总共扩增出 78 个位点，平均每个引物 7.8 条带，总多态位点 68 个，每条引物扩增出来的多态位点数在 5~9 之间，其中 S48 和 S52 扩增出来的多态位点最多为 9 个(图 1)。



M: 2 000 bp Maker; n1-w5: 样品编号.

图 1 S52 对部分样品 DNA 的扩增结果图

2.3 多态位点比率

综合分析得到，5 个领春木居群的总多态位点百分率(proportion of polymorphic sites/loci PPS)为 87.18%(表 1)，每个引物所扩增出的产物的多态性比率在每个居群都不同，其中 pop3 即城口居群扩增出 56 个多态位点，多态位点比率高达 71.79%。

表 1 各引物检测领春木各居群多态位点的比率

居群	样本	位点数	多态位点数	多态位点比率/%
pop1	5	78	48	61.54
pop2	5	78	54	69.23
pop3	5	78	56	71.79
pop4	5	78	49	62.82
pop5	5	78	47	60.26
总居群	25	78	68	87.18

2.4 Shannon 多样性指数

用 Shannon 指数估算 5 个领春木居群的遗传多样性^[5]，结果如表 2. 表 2 中 Hpop 显示的是居群内的平均多样性，Hsp 表示种内的多样性测度，Hpop/Hsp 则是居群内多样性所占的比例，群体间多样性比例为 (Hsp-Hpop)/Hsp. 5 个居群遗传多样性的排列次序从大到小依次为 pop3>pop2>pop5>pop4>pop1. 领

春木居群内遗传多样性平均值为 2.977 9, 种内遗传多样性平均值为 3.658 4. 在总遗传变异中, 领春木居群内和居群间遗传多样性所占的比例分别为 81.59%和 18.41%, 即经 Shannon 指数估计由 10 条引物检测到的 5 个居群间的遗传分化为 18.41%.

表 2 Shannon 信息指数估计的领春木居群的遗传多样性

Primer	pop1	pop2	pop3	pop4	pop5	Hpop	Hsp	Hpop/Hsp	(Hsp-Hpop)/Hsp
S1	2.006 4	1.652 4	2.946 3	2.062 2	2.429 4	2.219 3	2.645 8	0.838 8	0.161 2
S21	4.107 6	4.035 6	3.283 5	1.699 2	3.621 3	3.349 4	4.152 8	0.806 5	0.193 5
S32	1.404 6	1.712 4	2.340 0	2.049 6	2.002 8	1.901 9	2.432 7	0.781 8	0.218 2
S34	2.412 6	3.334 8	2.903 7	3.117 0	2.690 4	2.891 7	3.362 3	0.860 0	0.140 0
S48	3.958 5	3.911 7	4.936 5	3.697 8	2.997 6	3.900 4	4.920 2	0.792 7	0.207 3
S52	1.682 4	5.149 8	4.795 2	3.817 2	2.412 6	3.571 4	4.715 0	0.757 5	0.242 5
S61	2.690 4	2.903 7	3.378 0	4.693 2	3.378 0	3.408 7	4.060 7	0.839 4	0.160 6
S62	3.224 1	3.240 9	4.005 6	1.848 9	2.749 8	3.013 9	3.898 8	0.773 0	0.227 0
S64	2.186 1	3.254 1	1.528 5	1.682 4	2.216 1	2.173 4	2.736 8	0.794 1	0.205 9
S92	3.407 4	2.749 8	3.881 7	2.792 4	3.911 7	3.348 6	3.658 7	0.915 2	0.084 8
平均值	2.708 0	3.194 5	3.399 9	2.746 0	2.841 0	2.977 9	3.658 4	0.815 9	0.184 1

2.5 Nei 的遗传分化指数

Nei 指数(H)又称“基因多样性指数”^[6], 其大小与位点变异的多少成正比, 反映了领春木种质资源中基因的丰富程度及均匀程度. 用 Nei 指数对 5 个领春木居群中间基因多样性进行估测, 结果见表 3. 表 3 中 Ht 为总群体的基因多样性, Hs 为群体内的基因多样性, Dst 为群体中的基因多样性, Gst 为基因分化系数, $Gst=Dst/Ht$.

表 3 Nei 指数估计的领春木各居群的基因多样性

primer	pop1	pop2	pop3	pop4	pop5	Ht	Hs	Dst	Gst
S1	0.135 6	0.124 3	0.223 0	0.150 2	0.174 5	0.184 3	0.161 5	0.022 8	0.098 5
S21	0.310 2	0.319 8	0.244 0	0.117 9	0.279 5	0.304 5	0.254 3	0.056 2	0.162 7
S32	0.177 5	0.235 5	0.322 6	0.273 3	0.284 8	0.314 7	0.258 8	0.055 9	0.211 7
S34	0.236 8	0.323 8	0.284 5	0.295 0	0.274 1	0.325 6	0.282 9	0.042 7	0.112 4
S48	0.300 5	0.306 9	0.382 8	0.284 2	0.230 9	0.369 7	0.301 1	0.068 6	0.212 5
S52	0.114 8	0.351 9	0.328 6	0.254 5	0.165 8	0.312 2	0.243 1	0.069 1	0.178 5
S61	0.274 1	0.284 5	0.344 7	0.477 5	0.344 7	0.397 9	0.345 1	0.052 8	0.169 0
S62	0.283 5	0.272 6	0.356 1	0.159 9	0.230 8	0.329 3	0.260 6	0.068 7	0.194 1
S64	0.209 7	0.328 2	0.143 3	0.164 0	0.213 9	0.263 5	0.211 8	0.051 7	0.128 7
S92	0.330 2	0.263 8	0.390 4	0.266 0	0.394 6	0.359 8	0.329 0	0.030 8	0.075 0
平均值	0.237 3	0.281 1	0.302 0	0.244 3	0.259 4	0.316 2	0.264 8	0.051 4	0.159 0

10 条引物检测到的基因多样性从大到小依次为 $pop3>pop2>pop5>pop4>pop1$. 根据 Nei 遗传分化指数估算 5 个居群总群体的基因多样性为 0.316 2, 群体内的基因多样性为 0.264 8, 群体中的基因多样性为 0.051 4, 基因分化系数 0.159, 表明居群间的分子变异只占总基因多样性的 15.9%, 大部分的遗传变异(84.1%)存在于居群之内.

2.6 遗传距离矩阵(表 4)

遗传距离矩阵显示出, 从遗传相异性来说 5 个居群间的遗传距离都不是很大, 居群 1 和居群 2 的遗传

距离最小只有 0.0294, 居群 4 和居群 5 的遗传距离相对最大为 0.0817; 从遗传一致性来说, 居群 4 和居群 5 之间的遗传相似度最高, I 值为 0.9215; 居群 1 和居群 2 的遗传相似度最低, I 值为 0.9712. 这可能是由于地理位置的原因, 南川和万盛比邻, 巫溪和开县间二者则相距较远, 基因交流少, 所以使得居群 4 和居群 5 之间在遗传上产生了一些分子变异.

表 4 领春木 5 个居群间的遗传距离矩阵

pop ID	1	2	3	4	5
1	* * * *	0.971 0	0.951 1	0.943 4	0.967 9
2	0.029 4	* * * *	0.970 4	0.940 8	0.960 6
3	0.050 1	0.030 1	* * * *	0.935 9	0.940 7
4	0.058 2	0.061 0	0.066 2	* * * *	0.921 5
5	0.032 6	0.040 2	0.061 1	0.081 7	* * * *

注: 右上角为遗传一致度(I), 左下角为遗传距离(D).

2.7 领春木居群聚类分析

采用算术平均数的非加权成组配对法(UPG-MA)对 Nei 的遗传距离进行聚类分析, 结果见图 2, 其归并结果与实际的地理分布情况一致, 距离较近的归在了一起. 距离较远的遗传距离也较远.

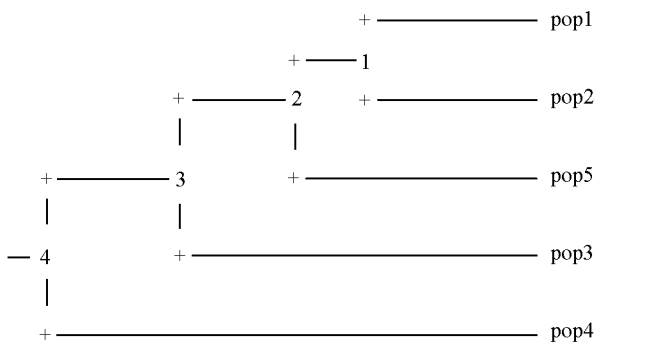


图 2 领春木 5 个居群的 UPGMA 聚类图

3 结 论

通过 Nei 指数和 Shannon 指数估算的领春木各居群遗传变异的分布基本上一致, 均显示出大部分的分子变异存在于领春木居群之内, 只有少量的分子变异存在于居群之间, 说明 5 个领春木居群具有很相似的基因频率. 为了进一步证明领春木分子变异的机理, 运用 popgen32 软件运算得到其基因流 $N_m=2.5301$. 当 $N_m>1$ 时, 基因流可以防止遗传漂变引起的居群间的遗传分化. 因此, 当 N_m 值升高时, G_{st} 值降低, 说明领春木居群的遗传变异不是由遗传漂变所引起. 梅里尔^[7]认为, 如果邻近有相似的基因频率, 可能只是表明它们具有相同的选择压力而并不能证明有基因流动. 综合领春木的生境片状分布特点, 领春木邻近居群相似的基因频率, 可能是由于生境选择压力所致, 某些扩增片断的频率在群体中的变化也证实了这个问题. 同时从聚类分析的结果来看, 居群间的遗传距离和地理距离是相一致的, 因此认为引起重庆市野生领春木日益减少的主要原因不是在遗传方面, 而可能是人为的干扰破坏. 为切实保护好濒危植物领春木, 实现其资源的可持续利用, 建议在人为活动较强的地区, 加大宣传力度, 有效控制对领春木的滥砍滥伐; 实行就地保护, 合理采伐; 在种质资源分布集中的地域, 建立领春木自然保护区(点), 禁止破坏性利用, 防止各种人为干扰, 充分发挥领春木群落的生态和经济效益. 植物园可引种栽培, 在其适宜生长的地区可栽作绿化观赏树种.

参考文献:

[1] 《四川植物志》编辑委员会. 四川植物志 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988: 30—31.
[2] 马洪菊. 重庆市珍稀濒危植物信息系统 [D]. 重庆: 西南大学, 2003.
[3] 何 建, 何 桥, 张连峰, 等. 桃树不同材料 DNA 提取的探讨 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(1): 139—140, 144.
[4] 刘朝贵, 李小孟, 须 建, 等. 三大产区莼菜遗传多样性及亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版,

2012, 34(10): 54—59.

[5] WACHIRA F N, et al. Detection of Genetic Diversity in Tea (Camellia Sinensis) Using RAPD Markers [J]. Genome, 1995, 38(2): 201—210.

[6] NEI M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Population [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70(2): 3321—3323.

[7] 梅里尔 D.J. 生态遗传学 [M]. 黄瑞复, 魏蓉城, 晏一祥, 译. 北京: 科学出版社, 1991.

Genetic Diversity Analysis in *Euptelea pleiospermum*

WANG Fang¹, HE Ping², ZHENG Yi-feng³

1. Departmengt of Resources and Environment , Agricultural and Animal Husbandry College of Tibet University , Nyingchi Tibet 860000 , China ;
2. School of Life Science , Southwest University , Chongqing 400715 , China ;
3. Yuanpei College , Shaoxing University , Shaoxing Zhejiang 312000 , China

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to estimate the genetic diversity in 5 populations of the endangered plant species *Euptelea pleiosperma* from Chongqing. The total percent of polymorphic loci was 87. 18%. Based on the estimated Shannon’s diversity index and Nei’s gene diversity index, the genetic diversity of the 5 populations was in the sequece of pop3 (Kaixian) > pop2 (Nanchuan) > pop5 (Wansheng) > pop4 (Wuxi) > pop1(Chengkou), and most of genetic differentiation (> 80%) occurred within the population. Genetic distance matrix and UPGMA cluster analysis showed that the genetic diversity was coherent with geographical disribution.

Key words: *Euptelea pleiosperma* ; RAPD; genetic diversity

责任编辑 夏 娟

