

濒危植物华东黄杉种群遗传多样性 ISSR 分析

李艳^{1,3}, 鲁顺保¹, 刘晓燕^{1,4}, 江玉梅¹, 李思光⁴, 朱笃^{1,2*}

(1. 江西师范大学生命科学学院, 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 南昌 330022;
2. 江西省宜春学院, 江西宜春 336000; 3. 新建二中, 南昌 330100; 4. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘要: 采用 ISSR 分子标记技术分析了 5 个华东黄杉居群的遗传多样性水平和居群遗传结构。用 10 个引物对 5 个居群共 76 个样品进行扩增, 共得到 76 条清晰的扩增带, 其中 69 个位点为多态性位点。在物种水平上, 多态性百分率 (PPB) 为 90.79%, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.3361, Shannon's 信息多样性指数 (I) 为 0.4974。在居群水平上, 多态性位点百分率在 56.58%~85.53% 之间, Nei's 基因多样性指数为 0.2084~0.2675, Shannon's 信息多样性指数为 0.2695~0.4076。物种和居群遗传多样性水平都较高, 居群间产生了一定的遗传分化 ($G_{st}=0.2366$, $\Phi_{st}=26.88\%$)。由 UPGMA 聚类分析可知, 在 5 个居群中, 湖南阳明山两支与浙江临安先聚为一支, 再与安徽休宁聚为一支, 最后与江西三清山聚合。鉴于华东黄杉生境的特殊性和人为大量的砍伐, 华东黄杉的数量逐渐减少, 建议在华东黄杉分布区建立自然保护区, 对其生存空间进行长期、有效的保护。

关键词: 华东黄杉; ISSR; 遗传多样性; 遗传结构; 保护策略

中图分类号: Q346+.5; Q949.66+6 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X(2010)01-0038-05

ISSR Analysis on Genetic Diversity of Endangered Plant *Pseudotsuga gaussenii* Flous

LI Yan^{1,3}, LU Shun-Bao¹, LIU Xiao-Yan^{1,4}, JIANG Yu-Mei¹, LI Si-Guang⁴, ZHU Du^{1,2*}

(1. College of Life Sciences Jiangxi Normal University, Jiangxi Provincial Key Lab of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources, Nanchang 330022, China; 2. Yichun College of Jiangxi Province, Yichun, Jiangxi 336000, China; 3. Xinjian No.2 High School of Jiangxi Province, Nanchang 330100, China; 4. School of Life Sciences Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Genetic diversity and genetic differentiation of *Pseudotsuga gaussenii* Flous were analyzed by using inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular technique. ISSR amplification was conducted with 10 primers for 76 individuals from 5 populations, and 69 polymorphic loci were detected from 76 loci, indicating high genetic variation at species level ($PPB=90.79\%$, $H=0.3361$, $I=0.4974$) and at population level ($PPB=56.58\% - 85.53\%$, $H=0.2084 - 0.2681$, $I=0.2695 - 0.4076$). A certain level of genetic differentiation occurred among populations ($G_{st}=0.2366$, $\Phi_{st}=26.88\%$). The program of genetic relationships among populations was constructed based on Nei's gene distance. Two populations of Yangmingshan and Zhejiang clustered in a clade, then Anhui population and them clustered in a clade, and last Sanqingshan population clustered in a clade. In view of the genetic information available for *P. gaussenii* Flous, the number of *P. gaussenii* Flous has been dropping off. It is suggested that nature reserve should be founded in the distributing areas of *P. gaussenii* Flous to long-timely and effectively preserve the living space of *P. gaussenii* Flous.

Key words: *Pseudotsuga gaussenii* Flous; ISSR; Genetic diversity; Genetic structure; Conservation strategy

收稿日期: 2009-01-16, 修回日期: 2009-04-13。

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目 (0430014)。

作者简介: 李艳 (1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生态学。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: zhudu12@163.com)。

华东黄杉 (*Pseudotsuga gaussenii* Flous) 为杉科黄杉属植物,分布地狭窄,仅在中国东部中亚热带高海拔地区的安徽南部、浙江西部、湖南永州市、江西等地零星分布。多生长于海拔 600 ~ 1500 m 丘陵山地,喜温凉湿润气候,幼树需荫庇环境,且种子多数不孕造成繁殖困难。由于长期采伐利用,加以种子可孕率极低,更新能力很弱,林木日益减少,现为我国特有珍稀罕见种,列为国家二级保护濒危植物,对研究我国南方植物区系的发生、演化有重要的意义。同时,华东黄杉由于硬度适中,不翘不裂且耐久用,可作为上等的用材树种,具有较高的应用价值而受到学者的广泛重视^[1,2]。

ISSR 技术^[3]是建立在 PCR 反应基础上的一种分子标记技术。具有操作技术简单,不需要预知基因组序列检测多态性能力强等优点,且比 RAPD 技术更加稳定可靠,实验重复性好,因而是非常理想的分子标记^[4,5]方法。迄今为止,关于华东黄杉的研究不多,一些学者仅围绕华东黄杉的大痣小蜂生物学特性进行了初步的研究^[6],积累了某些部分的资料,但对于华东黄杉的遗传多样性和保护生物学方面的研究还未见报道。因此,本文通过采用 ISSR 分子标记技术,对中国 5 个华东黄杉居群的遗传变异进行分析,以期阐明其遗传多样性水平及其动态变化,为华东黄杉的保护提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

根据地理位置的自然隔离,将华东黄杉的分布区分为 5 个自然居群,即居群 I (江西省上饶市三清山风景区,简称 SQS)、居群 II (安徽省休宁冯村六股尖,简称 XN)、居群 III (浙江省临安市上溪村、源头村、狮溪村,简称 LA)、居群 IV (湖南省永州市阳明山自然保护区,简称 YMZRQ)、居群 V (湖南省永

州市阳明山老屋场,简称 YMLWC)。按其分布均匀采样。采取当年萌发的新叶,放在保鲜袋中,用硅胶干燥,带回实验室后置于 -70℃ 超低温冰箱中保存备用。各群体所在地及其生境状况见表 1。

1.2 DNA 的提取与检测

华东黄杉叶片基因组 DNA 采用改良的 CTAB 法^[7]提取,DNA 纯度和含量采用紫外可见分光光度计测定。以 $\omega = 0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量,电泳结果 DNA 带清晰(图 1),表明 DNA 质量较好。

1.3 PCR 扩增与引物筛选

在 ISSR 扩增最优条件下^[7],每个居群选取 1 个模板,对由哥伦比亚大学(UBC)提供序列、上海生工公司合成的 100 条 ISSR 引物进行筛选。从中筛选出扩增条带较多、信号强、背景清晰的 10 条引物(表 2)用于 5 个居群 76 个 DNA 样本扩增(图 2)。PCR 产物在含有 EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,以 100 bp DNA Ladder Plus Marker 作为标准分子量对照,凝胶成像系统观察照相。

1.4 统计分析

1.4.1 居群遗传多样性分析 在琼脂糖凝胶电泳图谱中,根据分子量标准对照反应产物在凝胶上的位置,估计扩增产物的分子量大小。同一 ISSR 位点上有电泳带记为 1,无电泳带的记为 0,作 0,1 矩阵输入计算机。假定种群在这些 ISSR 标记位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,采用 POPGENE 1.31 程序^[8],统计下列参数:①多态性位点百分比(*PPB*);②各个居群的 Nei's 基因多样性指数(*H*)和 Shannon's 多态性信息指数(*I*);基因分化系数(*G_{st}*)和基因流(*N_m*);④遗传距离(*D*)和遗传一致度(*I*)。

1.4.2 居群内和居群间遗传变异分析 分子方差分析(AMOVA)方法可直接对 ISSR 等显性标记的数据进行分析。计算居群的表形变异时,不依赖各

表 1 华东黄杉居群的来源、海拔及采样数
Table 1 Location, altitude and sample number of *Pseudotsuga gaussenii* Flous

居群 Populations	来源 Location	经纬度 Latitude	海拔(m) Altitude	采样数 Sample number
I 江西三清山(SQS)	江西省上饶市三清山风景区	28°55'531" N, 118°03'075" E	1250	16
II 安徽休宁(XN)	安徽休宁冯村六股尖	29°43'438" N, 118°18'997" E	900	11
III 浙江临安(LA)	浙江省临安市上溪村、源头村	30°13'330" N, 118°58'360" E	850	17
IV 湖南阳明山(YMZRQ)	湖南永州市阳明山自然保护区	26°05'832" N, 111°57'368" E	940	16
V 湖南老屋场(YMLWC)	湖南永州市阳明山老屋场	26°04'561" N, 111°56'212" E	965	16

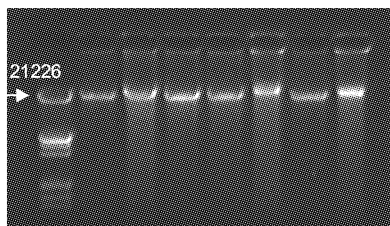


图1 华东黄杉 DNA 电泳图
Fig. 1 The electrophotogram of *Pseudotsuga gaussenii* Flous genomic

表2 ISSR 分析用的 10 个引物序列

Table 2 Sequence of 10 primers used for ISSR analysis

引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence
U808	(AG) ₈ C	U868	(GAA) ₆
U811	(GA) ₈ C	U873	G(ACAG) ₃ ACA
U815	(CT) ₈ G	U879	(CTTCA) ₃
U835	(AG) ₈ YC	U880	(GGAGA) ₃
U836	(AG) ₈ YA	U881	GGGTGGGGTGGGGTGg

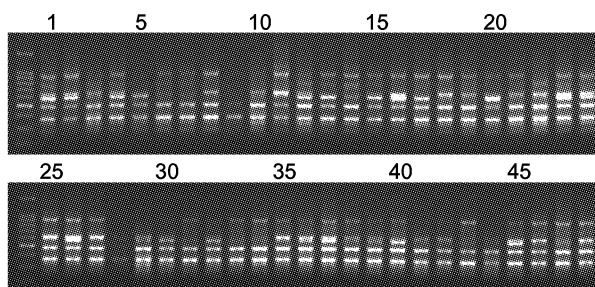


图2 引物 811 对华东黄杉部分样品的扩增结果
Fig. 2 Bands of *Pseudotsuga gaussenii* Flous with ISSR primer 811

种假设条件。因此本研究进一步采用 WINAMOVA 1.55 软件^[9]对华东黄杉居群内和居群间的分子变异进行了分析。

1.4.3 聚类分析 用 NTSYS-pc 2.10e^[10] 中的 SHAN 和 TREE 程序对 POPGENE 得到的遗传距

离矩阵进行 UPGMA 聚类分析,建立聚类分支图。

2 结果与分析

2.1 华东黄杉的 ISSR 遗传多样性

从 100 条引物中筛选出 10 条 ISSR 引物,对中国 5 个华东黄杉居群的 76 个样品进行 ISSR 分析,共检测到 76 个位点,每个引物产生 4~11 个位点不等,位点分子量范围均在 300~3000 bp 之间,其中 69 个为多态性位点,占 90.79%。Nei's 基因多样性 $H=0.3361$, Shannon's 多态性信息指数 $I=0.4974$,各个居群的 Nei's 基因多样性指数在 0.2084~0.2675 之间,Shannon's 信息多样性指数为 0.2695~0.4076 之间,两者与多态性位点百分率变化趋势一致。这表明华东黄杉居群的遗传多样性偏高,而其中三清山华东黄杉居群遗传多样性相对来说最高(表 3)。

2.2 华东黄杉居群间遗传变异的分析

华东黄杉 5 个居群间的遗传分化指数 $G_{st}=0.2366$,表明总的遗传变异中有 23.66% 的变异存在于居群间,居群内的遗传变异为 76.34%。对 5 个居群进行 AMOVA 分析,结果显示在总的遗传变异中有 26.88% 的变异发生在居群间,73.12% 的变异发生在居群内(见表 4),居群间和居群内变异均为极显著 ($P<0.001$),此结果与 popgene 中 Nei's 分析所得的结果 ($G_{st}=0.2366$) 大体一致。居群的遗传分化表明华东黄杉居群间出现了一定的遗传分化。

2.3 遗传距离与聚类分析

ISSR 分析所得的 I 值和 D 值见表 5。5 个居群相互之间的 I 值变化范围为 0.7414~0.9442, D 值的变化范围为 0.0574~0.2993。1 和 5 居群间的遗传距离最大 ($D=0.2993$),4 和 5 居群之间的遗传距离最小 ($D=0.0574$)。遗传一致度与遗传距离

表3 华东黄杉居群的遗传多样性分析

Table 3 Statistical analysis of genetic diversity in *Pseudotsuga gaussenii* Flous populations

居群 Population	样品数 No. of samples	多态性位点数 No. of polymorphic-loci	多态性位点比(%) PPB	Nei's 基因多样性 H	Shannon's 指数 I
SQS	16	65	85.53	0.2675	0.4076
XN	11	43	56.58	0.2084	0.3064
LA	17	60	78.95	0.2681	0.2695
YMZRQ	16	54	71.05	0.2631	0.3900
YMLWC	16	56	73.68	0.2602	0.3898
总计 Total	76	69	90.79	0.3361	0.4974

表 4 华东黄杉居群内和居群间的 AMOVA 遗传多样性分析
Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA)
within/among *Pseudotsug gaussenii* Flous
populations (76 individuals)

变异来源 Source of variation	自由度 df.	均方差 MSD	变异组分 (%) Φ_s	P
居群间 Among population	4	80.581	26.88	<0.001
居群内 Within population	71	10.952	73.12	<0.001

相互对应。经软件 IBD 检验表明,华东黄杉居群间的遗传距离和地理距离之间呈现出一定的相关性,即地理距离越近遗传距离越小,地理距离越远遗传距离越大。根据聚类图(见图 3),在 5 个居群中,湖南阳明山两支与浙江临安先聚为一支,再与安徽黄山聚为一支,最后与江西三清山聚合。

表 5 华东黄杉 5 个居群间遗传一致度 I (右上角)和
遗传距离 D (左下角)

Table 5 Genetic identity and genetic distance
among 5 *Pseudotsug gaussenii* Flous populations

Pop. ID	1	2	3	4	5
1	****	0.8578	0.8519	0.8243	0.7414
2	0.1534	****	0.8904	0.8882	0.8508
3	0.1603	0.1161	****	0.9250	0.9273
4	0.1932	0.1185	0.0780	****	0.9166
5	0.2993	0.1616	0.0755	0.0574	****

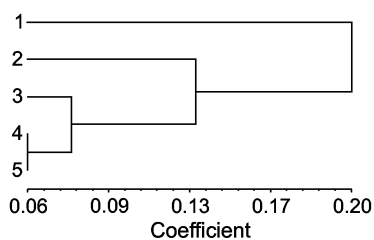


图 3 华东黄杉居群间遗传距离的 UPGMA 聚类图
Fig.3 UPGMA program for 5 populations of
Pseudotsug gaussenii Flous based on
Nei's genetic distance

3 讨论

3.1 华东黄杉的遗传多样性分析

本研究从群体遗传学角度,对中国华东地区特有的濒危植物华东黄杉进行了 ISSR 分析,发现华东黄杉的 5 个居群遗传多样性水平中,多态性位点百分比为 90.79%,Nei's 基因多样性 $H=0.3361$,

Shannon's 多态性指数 $I=0.4974$,明显高于 Hamrick 和 Godt^[11]在 220 个属 662 个种的林木中总结的物种遗传多样性平均水平 ($P=64.7\%$, $H=0.257$)。葛永奇等^[12]在研究孑遗植物银杏的遗传多样性时,发现物种水平 $PPB=70.45\%$, $H=0.3599$ 。代文娟等^[13]在研究濒危植物资源冷杉的遗传多样性时,发现多态性位点百分比为 68.87%, $H=0.2922$, $I=0.4428$ 。苏应娟等^[14]在对陆均松遗传多样性研究时,发现其多态性位点百分比只有 33.3%。上述比较结果表明,华东黄杉具有很高的遗传多样性水平。江西三清山、湖南阳明山以及浙江临安的华东黄杉群落结构比较完整,各年龄级的树种发育趋势良好。不同的年龄级树种在遇到选择压力时,适宜的基因就保留遗传下来,因此积累了较多的基因,形成了较广泛的遗传基础。而安徽休宁的植被遭到了人为的破坏,没有得到很好的保护,居群的遗传多样性较低。

3.2 华东黄杉的遗传结构

Ellstrand 和 Elam^[15]认为, $G_{st} > 0.1$ 意味着居群间分化程度较高,华东黄杉的 $G_{st}=0.2366$,也高于 Hamrick 和 Godt^[16]在 220 个属 662 个种的林木中总结的遗传分化的平均水平 ($G_{st}=0.129$),表明华东黄杉居群间分化较大。采用 AMOVA 进一步分析结果也表明居群间存在较高水平的遗传分化 (0.2688)。华东黄杉的遗传变异大部分存在居群内,居群间也有一定的遗传分化。基因流大于 1,居群间保持一定的基因流,但基因流受到群体间基因交换需要依靠个体的散布力、气候、迁移者与土著种成功杂交的可能性等许多因素的影响,华东黄杉喜温凉湿润气候,更新能力低,种子多数不孕造成繁殖困难,对基因流又造成了一定的阻碍,因此居群间也存在一定的遗传分化。因此建议在华东黄杉当地负责保护,各分布点的林业部门采取措施保护母种,以促进天然更新和扩大种植。

3.3 保护生物学意义

华东黄杉是局限分布于小地形、小气候的特殊环境中,需要特殊的生态位。在长期的演替过程中,与周围的环境形成了一种和谐、稳定的复杂多层树种结构。稳定的群落结构对华东黄杉的遗传多样性的保持有重大意义。华东黄杉是良好的用材树种和珍贵的观赏物种,成年树经常被砍伐,而幼年树被挖植,有时为了经济效益,各地的森林遭到破坏,华东

黄杉便失去了其赖以生存的群落结构。因此我们建议加大对安徽休宁森林资源的管理,创造优越的森林环境,恢复植被,建立生物多样性的保护体系,使华东黄杉在群落中逐渐形成优势种,保护好华东黄杉的遗传多样性。其二,华东黄杉一般 15 年开花结果,可孕种子极少,有的甚至全部不孕,或胚干瘪被虫害,繁殖极其困难,再者华东黄杉的天然更新能力很弱,导致树种株数逐渐减少。因此建议开展华东黄杉的引种栽培研究,建立华东黄杉的树木园或植物园,为华东黄杉创造适宜条件,广泛孕种繁殖,持续利用。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物[M]. 上海:上海教育出版社,1989.
- [2] 宋朝枢. 中国珍稀濒危保护植物[M]. 北京:中国林业出版社,1989.
- [3] Zietewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20: 176 – 183.
- [4] Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 40 – 45.
- [5] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. *遗传*, 2002, 24(5): 613 – 616.
- [6] 章今方, 胡国良. 华东黄杉的大痣小蜂生物学特性的研究[J]. *森林病虫通讯*, 1994, 2: 8 – 9.
- [7] 刘晓燕, 鲁顺保, 江玉梅, 李思光, 朱笃, 陈晖. 华东黄杉 ISSR 引物反应体系的优化与筛选[J]. *江西农业大学学报*, 2007, 29(6): 1021 – 1025.
- [8] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, *et al.* The user-friendly shareware for population genetic analysis [M]. Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1997.
- [9] Excoffier L. Analysis of Molecular Variance. Version 1.55 [M]. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1993.
- [10] Rohlf F J. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2. 1 [M]. New York: Exeter Software, Setauket, 2000.
- [11] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species[J]. *New Forest*, 1992, 6: 95 – 124.
- [12] 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 傅承新. 孑遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *生物多样性*, 2003, 11(4): 276 – 287.
- [13] 代文娟, 唐绍清, 刘燕华. 叶绿体微卫星分析濒危植物资源冷杉的遗传多样性[J]. *广西科学*, 2006, 13(2): 151 – 155.
- [14] 邹喻苹, 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.
- [15] Ellstrand N C, Elam D R. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1993, 24: 217 – 242.
- [16] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species[J]. *New Forest*, 1992, 6: 95 – 124.