

迁地保护的金花茶遗传多样性评价

韦 霄^{1,2,3}, 韦记青², 蒋水元², 蒋运生², 唐 辉², 叶万辉^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; 2. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 中国科学院 广西桂林 541006; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 采用 ISSR 分子标记技术对迁地保护的金花茶 3 个人工栽培居群进行遗传多样性分析。揭示了迁地保护金花茶的遗传多样性水平和结构。11 条引物共扩增出 87 条带, 其中 36 条具有多态性, 多态位点比例 (P) 为 41.38%。单个居群的多态带百分率 P 从 21.84% 到 25.29%, 平均值为 24.14%。在物种水平上, 期望杂合度和 Shannon 信息指数分别为 0.152 5 和 0.227 3; 在居群水平上, 期望杂合度和 Shannon 信息指数分别为 0.106 9 和 0.152 8。通过与野生居群遗传参数比较, 表明该种质圃基本有效地保护金花茶的遗传多样性总水平。遗传分化系数为 0.299 0。表明迁地保护金花茶遗传变异发生在居群内的个体间占 70.10%、29.90% 的遗传变异发生在居群间。

关键词: 金花茶; 种质圃; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)03-0215-04

Genetic diversity evaluation of ex-situ populations of *Camellia nitidissima*, detected by ISSR markers

WEI Xiao^{1,2,3}, WEI Ji-qing², JIANG Shui-yuan²,
JIANG Yun-sheng², TANG Hui², YE Wan-hui^{1*}

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Genetic diversity of 3 ex-situ population of *Camellia nitidissima* was detected by ISSR markers. 87 bands were generated by 11 ISSR primer, of which 41.38% bands were polymorphic. The percentage of polymorphic bands (P) was from 21.84% to 25.29%, 24.14% on average at the population level. Expected heterozygosity (Ht) and Shannon's information (Ho) were 0.152 5 and 0.227 3 respectively at specific level, 0.106 9 and 0.152 8 at population level. Compared with the parameters form natural population, the germplasm nursery maintained most genetic diversity of *Camellia nitidissima*. More than 70% of genetic diversity resided among individuals within population.

Key words: *Camellia nitidissima*; germplasm nursery; genetic diversity; ISSR

金花茶属山茶科山茶属金花茶组 (Theaceae, 1979), 为常绿灌木或小乔木。是世界上著名的观赏植物。山茶科植物的花色有深红、粉红、白色、复色

收稿日期: 2005-01-25 修订日期: 2005-04-10

作者简介: 韦 霄 (1967-), 男, 广西天峨县人, 副研究员, 博士生, 主要研究方向: 经济植物的引种驯化和濒危植物的保护生态学, E-mail: weixiao@scbg.ac.cn。* 通讯作者 E-mail: why@scbg.ac.cn

等多种颜色,但缺少黄色。虽然早在中国明朝李时珍所著《本草纲目》就记载过黄色山茶,然而自 1933 年首次在广西防城采到金花茶标本(左景烈 23483),1948 年戚经文先生(叶创兴,1997)发表定名为 *Camellia nitidissima* Chi,以后较长时期内未引起广泛的重视。黄色的山茶花金花茶于 1960 年在广西邕宁再次发现,并于 1965 年正式发表。这一发现引起了国内外植物学界和园艺学界的关注,尤其引起国际山茶学会的高度重视。金花茶被誉为“茶族皇后”,轰动了世界各国的园林界,称金花茶为“植物大熊猫”。目前世界各地相继引种,并利用金花茶的黄色基因,培育出新的品种,成为茶族中的一支独秀。

金花茶组植物是世界珍稀的观赏植物和种质资源,资源量十分有限。1998 年山茶科山茶亚科的《中国植物志》出版,书中记录了分布于中国的花山茶组植物共 16 种,其中金花茶系 15 种(张宏达等,1998)。其中金花茶列为国家一级保护植物(傅立国,1992)。金花茶产于我国广西南部 and 越南北部。主要分布于广西的邕宁、防城、东兴、扶绥和隆安等县(市)(梁盛业,1993)。分布区范围极为狭窄。金花茶主要生于沟谷两旁及附近山坡常绿阔叶林中。由于金花茶自身生物学特性和自然、人为因素的影响,在其分布区一般呈星散分布,单位面积个体数目少,稀有大的居群分布。目前其分布区正逐渐缩小。金花茶种质资源保护已是势在必行。

广西植物研究所的科研人员从 1980 年开始从事金花茶组植物的研究工作,已完成了金花茶组植物资源调查、种质资源收集、引种驯化等方面的研究,取得多项科研成果。目前已经把天然分布于热带季雨林中的金花茶组植物引种到中亚热带的桂林雁山,成功地建立了 2 hm² 的金花茶组种质圃,为中亚热带地区保存和利用金花茶种质资源做了开创性工作,为开展育种、分类系统研究奠定了基础。

本研究以建成的金花茶组植物种质圃的 3 个金花茶居群为研究对象,采用简单重复间序列(inter-simple sequence repeat, ISSR)分子标记技术,揭示迁地保护的金花茶的遗传多样性和遗传结构状况。

1 材料与方 法

1.1 金花茶种质圃概况

种质圃设在广西桂林雁山广西植物研究所,25° 11' N, 110° 12' E,属于中亚热带气候区。据气象观

测资料,试验地年平均气温为 19.2 °C,绝对最高气温为 40.0 °C,绝对最低气温为 -6 °C,冬季有霜冻,月平均气温高于 20 °C 有 6~7 个月;年均降雨量为 1 865.7 mm,年相对湿度 78%。种质圃金花茶为实生树。种子采自广西防城、东兴、邕宁、防城等县(市)。目前大部分已开花结果。

1.2 样品采集

实验材料取自于金花茶种质圃三个区域(划分为三个居群)的金花茶单株的叶子。每个居群各取 20 个个体的新鲜叶片,迅速装入封口袋。分别用硅胶迅速干燥固定,带回实验室分析。

1.3 总 DNA 提取和 PCR 扩增

用改进的 CTAB 法(Doyle, 1991)提取金花茶总 DNA。通过 1% 琼脂糖电泳检查 DNA 的完整性, -20 °C 保存备用。经过比较和优化,确定为 20 μL 的 PCR 反应体系为:反应体积为 20 μL,内含 20 ng 的模板 DNA, 10mM Tris-HCl(pH9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.7M MgCl₂, 0.1mM dNTPs, 2% formamide, 200nM primer and 1.5 units of Taq polymerase, 扩增反应在 PTC-100 型 PCR 仪上进行。每个引物均设一个空白对照反应,以排除系统误差。从哥伦比亚大学提供的 100 个 ISSR 引物中筛选出 11 个(UBC #. 808, 834, 835, 836, 840, 841, 848, 855, 857, 866, 880)能获得清晰条、产生多态的引物。扩增程序为:首先 94 °C 变性 5 min, 然后进行 35 个循环:94 °C 30 s, 51~53 °C (视不同的引物而定)45 s, 72 °C 90 s。最后 72 延伸 10 min。扩增产物在含有 EB(ethidium bromide, 0.1 μg/mL) 1.5% 的琼脂糖胶上,以 0.5×TBE 为电泳缓冲液检测分离,以 100bp DNA Ladder(100~1 500bp)(上海生物工程公司)作为相对分子质量标准。最后用紫外成像系统(LabWorks Software Version 3.0 UVP, Upland, CA 91786, USA)照相,保存图像。

1.4 数据处理和分析

ISSR 为显性标记,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,属于同一位点的产物并按扩增阳性(1)和扩增阴性(0)记录电泳带谱,形成 ISSR 表型数据矩阵用于进一步分析。采用 POPGENE V. 1.31 软件(Yeh 等,1999)计算出金花茶各个居群的平均等位基因数(A₀)、平均期望杂合度(H_E)、多态位点百分率(PPB)。在物种水平上整个居群的遗传变异(H_T)、居群内遗传多样性

(H_s)、遗传分化系数(G_{st}),以及 Nei's 遗传一致度 (I)以及 Shannon 多样性指数。

2 结果

2.1 ISSR-PCR 扩增结果

从 100 个引物中筛选出了 11 个扩增良好的引物,用于金花茶遗传多样性的检测。11 个引物扩增了 3 个金花茶居群 60 个个体,共扩增出 DNA 片段 87 条,平均每个引物扩增出 7.91 条带,扩增片段长

度在 230~1 600 bp 碱基对之间。其中 36 条具有多态性,多态位点百分数(P)为 41.38%。

2.2 金花茶遗传多样性水平分析

采用 POPGENE v1.31 软件计算得出的居群内的遗传多样性结果见表 1。多态位点百分率虽是遗传多样性的一个粗略估计,随引物选择标准会有较大差异,但可以比较正确的显示物种内居群内和居群间的遗传多样性水平。金花茶 3 个栽培居群中,单个居群的多态带百分率 P 从 21.84%到 25.29%,平均值为 24.14%。等位基因平均数从 1.182 2 到

表 1 金花茶居群内遗传变异

Table 1 Genetic variability within populations of *Camellia nitidissima* detected by ISSR analysis

居群 Population	Ao	Ae	H_E	H_o	P(%)
GA	1.252 9(0.437)	1.197 2(0.359)	0.108 3(0.191)	0.155 9(0.273)	25.29
GB	1.218 4(0.416)	1.182 2(0.355)	0.098 3(0.189)	0.140 0(0.268)	21.84
GC	1.252 9(0.437)	1.212 2(0.376)	0.114 1(0.200)	0.162 4(0.283)	25.29
平均 Average	1.241 4(0.430)	1.197 2(0.363)	0.106 9(0.193)	0.152 8(0.275)	24.14

Ao: 观察到的每个位点的等位基因数 Observed number of alleles per locus; Ae: 每个位点的有效等位基因数 The effective number of alleles per locus; H_E : 平均期望杂合度 Expected heterozygosity; H_o : Shannon 多样性指数 Shannon's information index; P: 多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci.

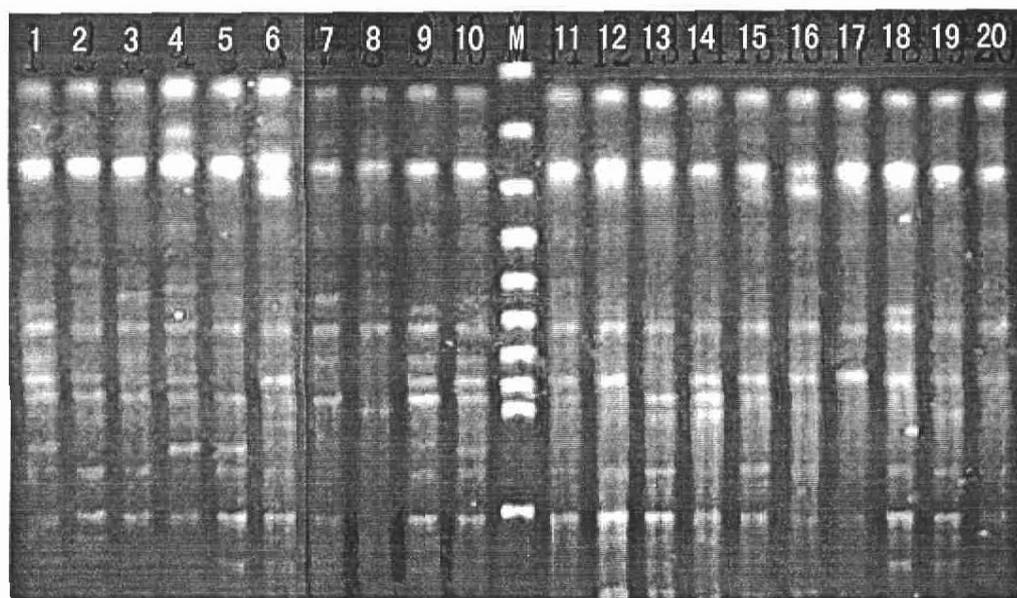


图 1 引物 UBC841 对金花茶 GA 居群的 ISSR 扩增谱带

Fig. 1 ISSR amplified bands of *Camellia nitidissima* samples of GA population with UBC841

M 代表 DNA 标准分子量 M represents DNA Marker.

1.212 2,平均值为 1.197 2。平均期望杂合度指数 H_E 值从 0.098 3 到 0.114 1,平均值为 0.106 9。Shannon 多样性(H_o)指数整个居群的遗传多样性值从 0.140 0 到 0.162 4,居群水平上平均值(H_{pop})为 0.152 8。在物种水平上,多态带百分率 P 为 41.38%;有效等位基因数(Ae)为 1.258 8;期望杂

合度指数 H_T 值为 0.152 5;Shannon 多样性指数 (H_{sp})为 0.227 3。

2.3 遗传结构分析

3 个金花茶居群间的遗传分化状况由总的遗传多样性(H_T),居群内遗传多样性(H_S),居群间基因分化比例(G_{ST})描述。采用 POPGENE v1.31 软件

对金花茶 3 个栽培居群 60 个个体的居群间遗传多样性分析的结果为 $H_T=0.1525$, $H_S=0.1069$, $G_{ST}=0.2990$ 。在总的遗传多样中,有 29.90% 来自于居群之间,也就是说总的基因多样性 70.10% 存在于居群内。

3 讨论

ISSR 分子标记是由 Zietkiewicz 等(1994)创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记。其基本原理在 SSR 的 5' 或 3' 端加锚 1~4 个嘌呤或嘧啶碱基,然后以此为引物,对两侧具有反向排列排列的 SSR 之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增,而不是扩增 SSR 本身,它在引物设计上比 SSR 技术简单得多,不需知道 DNA 序列即可用引物进行扩增,又可以揭示比 RFLP、RAPD、SSR 更多的多态性。该技术具有 DNA 样品用量少,操作简单,无需预先知道受试基因组 DNA 序列,结果记录方便,能提供丰富的关于基因组的信息等优点。近年来,已广泛应用于植物品种鉴定(Mondal, 2002)、遗传作图(Kojima 等, 1998)、基因定位(Ratnaparkhe 等, 1998)、遗传多样性(Ge 等, 2003; Wang 等, 2004)等研究。

本研究证明了 ISSR 分子标记技术有效地提供迁地保护金花茶的遗传多样性。我们曾采用同样的技术对金花茶 12 个天然居群的遗传多样进行了分析(见另文报道),结果为: $P=63.22\%$, $H_E=0.1561$ 。本实验结果为: $P=41.38\%$, $H_T=0.1525$ 。略低于天然居群相应各值。这一结果表明种质圃基本有效地保护金花茶的遗传多样性总水平。迁地保护基本成功。造成迁地保护居群遗传多样总体水平略低于天然居群可能有以下原因:第一,位于隆安县的居群由于人为干扰严重,植株未见开花结实,种子至今未能采集到。第二,迁地保护金花茶采用的是种子繁殖,采样过程中有可能会采自同一株母树有性繁殖的植株,从而降低了单位引物多态位点比率。为保护这一珍稀濒危植物,还应进一步继续加强金花茶

种质资源的收集工作,特别是收集隆安县的天然居群的种源,采取插条,进行扦插繁殖。

参考文献:

- Chang HT(张宏达). 1979. Chrysantha, a section of golden camellias from Cataysian flora(华夏植物区系的金花茶组)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*(中山大学学报(自然科学版)), 18(3): 69-74.
- Ye CX(叶创兴). 1997. A note on revision of latin name of golden Camellia(关于金花茶学名更替小记)[J]. *Guihaia*(广西植物), 17(4): 309-313.
- 张宏达,任善湘. 1998. 中国植物志(第 49 卷,第 3 分册)[M]. 北京:科学出版社, 101-112.
- 傅立国主编. 1992. 中国植物红皮书—珍稀濒危植物[M]. 北京:科学出版社
- 梁盛业. 1993. 金花茶[M]. 北京:中国林业出版社, 1-100.
- Doyle J. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[A]. In: Hewitt GM, Johnston A(eds). *Molecular Techniques in Taxonomy*[C]. Berlin: Springer, 283-293.
- Ge XJ, Yu Y, Zhao NX. 2003. Genetic variation in the endangered inner Mongolia endemic shrub *Tetraena Maxim.* (Zygophyllaceae)[J]. *Biological conservation*, 111: 427-434.
- Kojima T, Nagaoka T, Noda K. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers[J]. *Theor Appl Genet*, 96: 37-45.
- Mondal TK. 2002. Assessment of genetic diversity of tea(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction[J]. *Euphytica* 128: 307-315.
- Ratnaparkhe MB, Santra DK, Tullu A. 1998. Inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea[J]. *Theor Appl Genet*, 96: 348-353.
- Wang DL, Li ZC, Hao G. 2004. Genetic diversity of *Calocedrus macrolepis* (Cupressaceae) in southwestern China[J]. *Biochemicl systematics and ecology*, 32: 797-807.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. POPGENE. Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31[M]. Edmonton: University of Alberta.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 20: 176-183.