

濒危植物资源冷杉遗传多样性研究

苏何玲, 唐绍清*

(广西师范大学生物系, 广西桂林 541004)

摘要: 资源冷杉(*Abies ziyuanensis*)属松科(Pinaceae)冷杉属(*Abies*),是国家一级保护的濒危植物。利用RAPD分子标记对分布于广西资源县银竹老山和湖南省炎陵县大院的2个资源冷杉种群共54株进行了遗传多样性分析。用20个随机引物共扩增到126个位点,其中66个位点是多态性的,总的多态位点百分率为52.4%,在两个种群分别为33.6%和31.2%。Nei's基因多样性为0.312,Shannon信息指数为0.475,两个种群的遗传分化系数Gst为0.455。基于Nei's遗传距离进行了UPGMA聚类分析,结果两种群的样品彼此明显区分开来。分析结果表明资源冷杉种群内的遗传多样性较低,但两种群间的遗传分化明显。需要同时重视两分布地的资源冷杉的保护工作。

关键词: 资源冷杉; RAPD; 遗传多样性; 保护

中图分类号: Q16 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2004)05-0414-04

Genetic diversity of the endangered plant *Abies ziyuanensis* in two populations

SU He-ling, TANG Shao-qing*

(Department of Biology, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: *Abies ziyuanensis* is a member of Pinaceae. Genetic diversity was studied using random amplified polymorphic DNA(RAPD)in 54 individuals of *A. ziyuanensis* from two populations in Ziyuan County of Guangxi and Yanling County of Hunan Province. The twenty primers used in this study amplified 126 scorable RAPD loci. The result of POPGENE analysis shows that the percentage of polymorphic loci is 52.4% totally, 33.6% and 31.2% in the two populations respectively, while Nei's gene diversity is 0.312, and Shannon's information index is 0.475. The coefficient gene differentiation(Gst) between the two populations is 0.455. These indicate that there is low level of genetic diversity within populations, but high level of genetic differentiation between the two populations. The result suggested that the two populations of *A. ziyuanensis* should be considered individually when efforts were made to protect.

Key words: *Abies ziyuanensis*; RAPD; genetic diversity; conservation

资源冷杉(*Abies ziyuanensis* L. K. Fu et S. L. Mo)是松科(Pinaceae)冷杉属(*Abies*)植物,为国家一级保护的濒危植物(向巧萍,2001)。它分布于广西与湖南交界的银竹老山、湖南舜皇山、湖南炎陵县大院及江西井冈山(傅立国等,1980;刘起衍,1988;汪维勇等,1998),其中湖南炎陵县大院的资源冷杉的个体数超过1000株(肖学菊等,1991),银竹老山

超过100株,湖南舜皇山株数较少(傅立国等,1980),井冈山则只有4株(汪维勇等,1998)。

由于发现较晚,国内外学者对它的研究非常少,面对这种濒危的物种,对它的研究和保护已迫在眉睫。物种的遗传多样性是长期进化的产物,也是物种生存和发展的前提,对稀有和濒危物种遗传多样性和群体遗传结构的研究是揭示其适应潜力的基

收稿日期: 2003-12-19 修订日期: 2004-03-22

作者简介: 苏何玲(1973-),女,广西南丹县人,硕士,现工作单位:桂林医学院生物技术系。*通讯作者

础,也为进一步探讨稀有和濒危物种濒危机制,制定相应的保护措施提供相应的科学依据(葛颂等,1997)。本文应用 RAPD 分子标记对分布于广西资源县银竹老山和湖南省炎陵县大院的资源冷杉进行遗传多样性的研究,旨在为保护资源冷杉提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 取样

在广西资源县银竹老山取样 24 个个体,编号为 Y1~Y24 号;湖南炎陵县大院的中石牛坪和谢屋各取样 15 个个体,编号分别为 DZ1~DZ15 和 DX1~DX15。取枝条插于水中带回实验室,其叶用于提取总 DNA。另用 2 个元宝山冷杉个体作为外类群,编号为 B1,B2。

1.2 DNA 的提取与纯化

采用 CTAB 法(Doyle 等,1987)提取基因组总 DNA,方法略做改进。在加入 CTAB 提取缓冲液前先用丙酮清洗 2 次,并加大 CTAB 的浓度至四倍,延长水浴时间至 3 h。采用酚抽纯化法对总 DNA 进行纯化。

1.3 引物的筛选

用 6 个样品 DNA(2 个采自银竹老山、2 个采自大院、2 个元宝山冷杉)进行 PCR 扩增,从 100 个引物(上海生工公司)中筛选出 20 个扩增谱带清晰、重复性好的引物用于全部样品的扩增。

1.4 PCR 扩增及产物检测

20 μ L 的 PCR 反应体系包含:1 \times PCR Buffer,1 μ mol/L 引物,1U 的 Taq 酶,约 50 ng 模板 DNA,2.5 mmol/L MgCl₂,四种 dNTP 各 250 μ mol/L。PCR 反应在 Biometra UNOII PCR 仪上进行,扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后进行 45 个循环:94 $^{\circ}$ C 1 min,37 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 1.4% 琼脂糖电泳,EB 染色后在 FR200 生物显微图像分析系统上扫描成像。

1.5 数据分析

电泳图谱中的每一条带(250~2 500 bp)均视为一个分子标记。按凝胶同一位置上 DNA 带的有无进行统计,有带的记为 1,无带记为 0。用 POPGENE 32 软件(Yeh 和 Boyle,1997)计算分析多态性条带比率(P)、Nei's 基因多样性(H)、多样性指数(I)和基因分化系数(Gst)。用 NTSYS-pc 2.10

软件(Rohlf,1994)计算单株间的 Nei 遗传距离(Nei,1972),并用 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 资源冷杉的 RAPD 遗传多样性

从 100 个引物中筛选出 20 个 RAPD 引物,对 2 个种群的 54 个 DNA 样品进行 PCR 扩增,其中引物 S141 的扩增结果见图 1。这 20 个引物的序列、扩增得到的条带数及多态条带数见表 1。20 个引物共检测出 126 个位点,其中多态性位点 66 个,占 52.4%,在银竹老山和大院两个种群分别为 33.6% 和 31.2%。Nei's 基因多样性为 0.312,在两个种群分别为 0.183 和 0.161。Shannon's 多样性信息指数 I=0.475,在两个居群分别为 0.275 和 0.246(表 2)。

表 1 用于扩增的引物及其检测的位点数

Table 1 Primers and No. of loci obtained

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci
S122	GAGGATCCCT	5	2
S127	CCGATATCCC	11	8
S141	CCCAAGGTCC	7	4
S142	GGTGCGGAA	9	4
S143	CCAGATGCAC	5	0
S144	GTGACATGCC	4	1
S154	TGCGGCTGAG	6	1
S159	ACGGCGTATG	6	4
S28	GTGACGTAGG	4	1
S29	GGGTAACGCC	4	0
S35	TTCCGAACCC	5	2
S36	AGCCAGCGAA	7	6
S361	CATTTCGAGCC	6	3
S369	CCCTACCGAC	6	5
S370	GTGCAACGTG	5	4
S374	CCCCTACAC	4	3
S380	GTGTGCGGAC	8	5
S66	GAACGGACTC	8	3
S89	CTGACGTCAC	11	6
S92	CAGCTCACGA	5	4
总计 Total		126	66

2.2 资源冷杉两个种群遗传变异的分析

分析结果,总基因多样性 $H_t=0.315$,种群内的基因多样性 $H_s=0.172$,表明种群内的遗传变异多于种群间;基因分化系数 $G_{st}=0.455$,种群间的遗传变异占了总遗传变异的 45.5%。另外 66 个多态性位点中有 12 个位点是完全分化了的,发生了 12

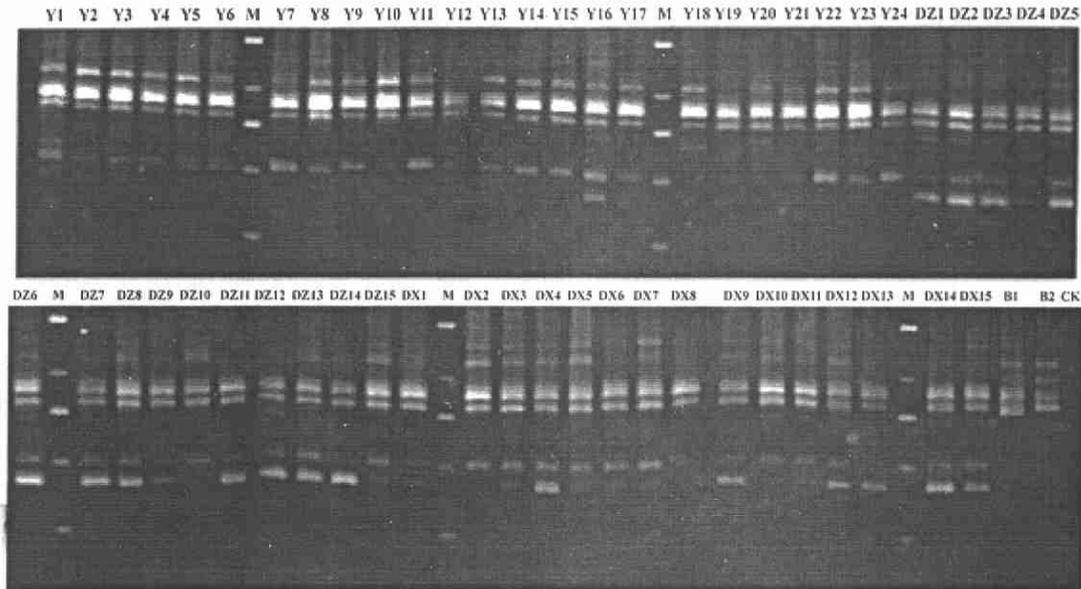


图 1 引物 S141 对资源冷杉样品的 RAPD 扩增谱带

Fig. 1 RAPD bands of *Abies ziyuanensis* samples amplified with primer S141

表 2 资源冷杉两个种群及总的多态位点百分数、遗传多样性、Shannon 信息指数及分化系数

Table 2 The PPL, H, I and G_{st} of *Abies ziyuanensis* in the two populations

种群 Population	总位点数 Total number of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点 百分数 PPL	Nei's 基因 多样性 H	Shannon's 指数 I	基因分化 系数 G _{st}
银竹老山 Yingzhu mountain	107	36	33.6	0.183	0.275	—
大院 Dayuan	109	34	31.2	0.161	0.246	—
总计 Total	126	66	52.4	0.312	0.475	0.455

PPL=The percentage of polymorphic loci; H=Nei's gene diversity; I=Shannon's information index. G_{st}=The coefficient gene differentiation.

个位点在种群的固定,也表明种群间产生了明显的遗传变异。

2.3 聚类分析

基于 Nei(1972)的遗传距离对 54 个资源冷杉单株进行 UPGMA 聚类分析,得到的聚类树状图见图 2。聚类分析结果显示银竹老山种群和大院种群的个体各自聚在一起,彼此明显地区分开来,这也表明两个种群间存在明显的遗传分化。

3 结 论

研究表明资源冷杉的 PPL 为 52.4%,高于银杉(*Cathaya argyrophylla*)的 PPL=38.6%(汪小全等,1996)和水杉(*Metasequoia glyptostroboides*)的 PPL=38.6%(李晓东等,2003)。但两个资源冷杉种群的 PPL 分别为 33.6%和 31.2%,种群内的遗传多样性水平较低。两种群产生了明显的遗传分化,种群间的遗传变异占了总遗传变异的 45.5%,发生了 12 个位点在种群的固定。

刚被发现时,两个种群的资源冷杉被定为两个种,广西资源银竹老山的冷杉定名为资源冷杉(*Abies ziyuanensis*)(傅立国等,1980),而湖南炎陵县大院的冷杉定名为大院冷杉(*A. dayuanensis*)(刘起銜,1988),资源冷杉与大院冷杉形态特征十分相近,目前有关分类学者认为两者应为同一物种(向巧萍等,1999)。从 RAPD 分析的结果表明两居群的冷杉遗传分化很明显,造成它们明显分化的原因很有可能是两个种群相距很远,已完全隔离,呈孤岛状分布,彼此之间没有基因的交流,各自独立进化。

资源冷杉被列于《中国植物红皮书》中(罗仲春等,1991),在 1998 年 ICUN 拟定的“针叶树行动计划”中被列为全球重点保护的针叶树种,是国家一级重点保护植物(向巧萍,2001)。对这种濒危的物种,在就地保护方面做了很大努力,在分布地设立了广西资源县银竹老山自然保护区、湖南桃源洞自然保护区、舜皇山自然保护区和江西井冈山自然保护区(向巧萍,2001)。大院的资源冷杉种群保护较好,但分布于广西资源县银竹老山的资源冷杉大树几乎被

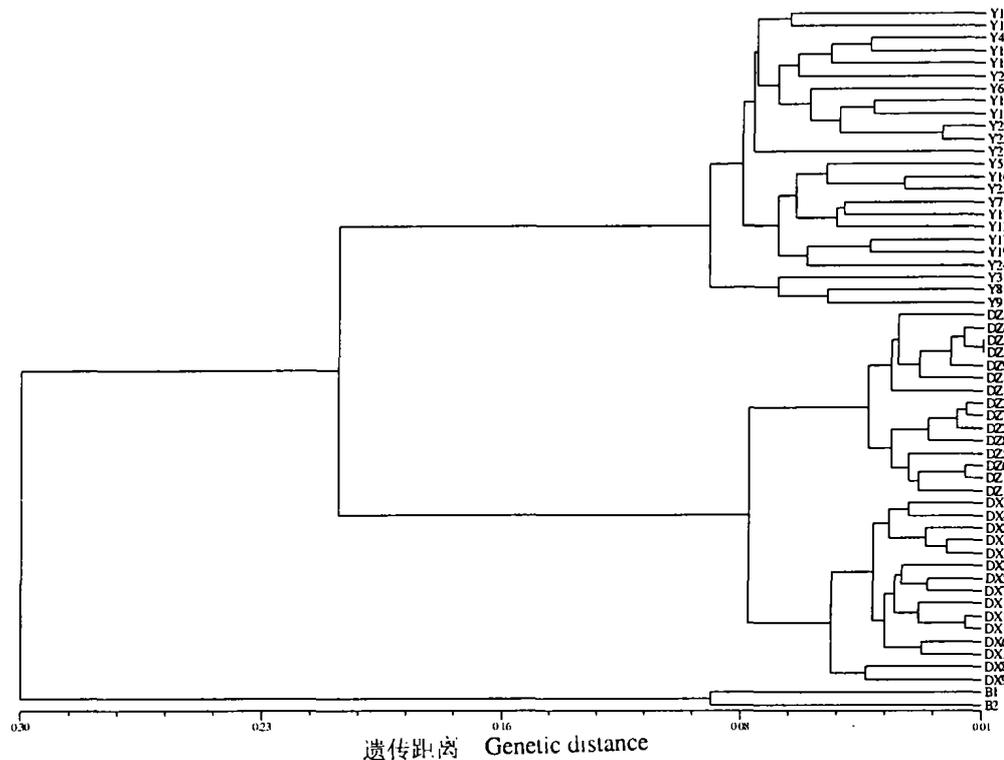


图 2 UPGMA 聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of UPGMA based on Nei's genetic distance of 54 trees of *Abies ziyuanensis*

砍完(向巧萍, 2001), 致使银竹老山的资源冷杉种群急剧缩小, 种群内个体数量可能已不足 100 株。由于资源冷杉两个主要分布地的个体遗传分化明显, 因此需要同时重视两分布地的保护工作。从保护现状来看, 尤其要重视广西资源县银竹老山的资源冷杉的保护工作。

本研究在采样考察时得到了广西师范大学大附中刘燕华老师及资源冷杉保护区员工的帮助, 在此表示衷心的感谢!

参考文献:

- 向巧萍, 于永福. 1999. 中国冷杉属的保护植物[J]. 植物杂志, (3): 1.
- 汪维勇, 裘利洪. 1998. 江西裸子植物多样性及保护[J]. 江西林业科技, 增刊: 13-15.
- 肖学菊, 康华魁. 1991. 关于大院冷杉的考查报告[J]. 湖南林业科技, (3): 38-40.
- 罗仲春, 陈湘健. 1992. 资源冷杉. 见: 傅立国. 中国植物红皮书(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 62-63.
- Doyle JJ, Doyle and JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf Tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Fu LK(傅立国), Lu YJ(吕庸浚), Mo SL(莫新礼). 1980. The genus *Abies* discovered for the first time in Guangxi and Hunan (冷杉属植物在广西与湖南首次发现)[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*(植物分类学报), **18**(2): 205-210.
- Ge S(葛 颂), Wang HQ(王海群), Zhang DM(张大明), et al. 1997. Genetic diversity and population differentiation of *Cathya argyrophylla* in Bamian mountain(八面山银杉林的遗传多样性和群体分化)[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), **39**(3): 266-271.
- Li XD(李晓东), Huang HW(黄宏文), Li JQ(李建强). 2003. Genetic diversity of the relict plant *Metasequoia glyptostroboides*(子遗植物水杉的遗传多样性研究)[J]. *Biodiversity Science*(生物多样性), **11**(2): 100-108.
- Liu QX(刘起銜). 1988. New plants from Hunan(湖南产新植物)[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究), **8**(3): 85-86.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations[J]. *American Naturalist*, **106**: 283-292.
- Rohlf FJ. 1994. NTSYS-PC(Version 2.10)[M]. New York: Applied biostatistics Inc.
- Wang XQ(汪小全), Zou YP(邹喻莘), Zhang DM(张大明), et al. 1996. Genetic diversity analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla*(银杉遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Science in China*(中国科学), **26**(5): 436-441. (in Chinese)
- Xiang QP(向巧萍). 2001. A preliminary survey on the distribution of rare and endangered plants of *Abies* in China (中国的几种珍稀濒危冷杉属植物及其地理分布成因的探讨)[J]. *Guihaia*(广西植物), **21**(2): 113-117.
- Yeh FC, Boyle TJB. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits[J]. *Belgian Journal of Botany*, **129**: 157.