

用 ISSR 分子标记检测不同尾矿废弃地白茅居群的遗传多样性^{*}

田胜尼^{1,2}, 王峥嵘¹, 高三红³, 郝艳茹¹, 彭少麟^{1,3}

(1 中国科学院华南植物园 // 广东省数字植物园重点实验室, 广东 广州 510650

2 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036 3 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 采用 ISSR 技术对安徽 4 个铜尾矿、1 个铅锌尾矿废弃地上自然定居的白茅和非矿区正常生境下 1 个白茅居群遗传多样性进行了研究。从 100 条 ISSR 引物中筛选出 10 条引物对 6 个居群 180 个样品进行 PCR 扩增, 共得到 139 扩增带, 其中多态位点为 132 条, 多态位点百分率为 94.96%。POPGENE 分析表明, 白茅居群的总遗传多样性为 0.3125 非矿区白茅的遗传多样性远高于另外 5 个矿区居群, 铅锌尾矿的遗传多样性最低, 6 个白茅居群之间出现明显的遗传分化 ($\varphi_{st}=0.030$ $P<0.002$), 各居群的个体各自聚在一起。上述结果可能是在金属尾矿废弃地胁迫下, 白茅居群遗传本质上产生了明显的遗传分化。

关键词: ISSR 金属尾矿废弃地; 白茅; 遗传多样性

中图分类号: Q16 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 04-0087-06

尾矿 (tailings), 又称尾沙, 是矿业部门在开采过程中, 将矿石经粉碎、浮选中矿、精矿后产生大量的固体粉末。这些尾矿除少量作为旧矿井的填充料之外, 其余绝大多数还以填充凹地或筑坝堆放的方式储存^[1]。长江中下游地区矿产资源分布较多, 这些矿产资源的开采, 为国民经济的发展做出了贡献。但在开采过程中, 产生了大量的矿业废弃地, 如尾矿场 (尾矿库)、排土场等。这些堆放的尾矿废弃地, 初期往往寸草不生。在经历一定的时间后, 废弃地上开始自然定居少数植物或通过人工的复垦方式定居一些植物。经过多年对安徽铜陵、安庆、池州等地的各种废弃地调查发现, 白茅 (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv. var.) 是铜尾矿废弃地和铅锌尾矿废弃地的绝对优势种, 在停止较久的尾矿上形成大规模的群落^[2]。

ISSR (Inter-simple sequence repeat), 简单重复序列间扩增, 是 Zietkiewicz 等 1994 年提出锚定微卫星 (SSR) 策略的一种分子标记, 即在 SSR 的 3' 端或 5' 端锚定 1~4 个简并碱基, 扩增两微卫星体之间序列的一种分子标记技术^[3]。同时 ISSR 技术可快速、高效和灵敏地检测出基因组 DNA 的多态性, 而且重复性好、操作简单, 成本较低。目前也广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、系统进化及分子生态学研究^[4-6]。

本文通过定居在安徽省铜陵市、安庆市铜尾矿以及池州市铅锌尾矿地自然定居的白茅作为研究对象, 以远离矿区正常土壤上生长的白茅居群作为对照, 用 ISSR 分子标记技术检测白茅居群内 (间) 的遗传多样性, 为探讨白茅在金属尾矿废弃地定居机制以及为金属尾矿废弃地的复垦、重金属污染的修复和治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本试验所用样品白茅, 采集于长江中下游地区安徽省沿江安庆市月山铜尾矿场 (YS)、池州市黄山岭铅锌尾矿场 (HSL)、铜陵市的五公里铜尾矿废弃场 (WGL)、铜官山尾矿库 (TGS)、狮子山尾矿库 (SZS)。对对照选定合肥市郊区 (HF), 距安庆月山铜矿、池州铅锌矿、铜陵市各矿均在 160 km 以上。安庆月山铜矿位于池州和铜陵市的长江上游, 距池州黄山岭铅锌矿 80 km 左右。在上述各采样点随机选择 30 个植株。每个体之间的距离尽可能保持在相距 20 m 以上。但池州市黄山岭铅锌尾矿场, 只有早期排放约 15 a 以上的铅锌尾矿上有少量的白茅定居生长, 面积约 100 m² 左右。因此无法保证个体的相距在 20 m 以上, 尽可能的拉大距离采集样品, 有少量个体采集于尾矿与正常

^{*} 收稿日期: 2005-08-04
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270282); 广东省优秀团队资助项目 (003031); 广东省重大基金资助项目 (B20801002)

作者简介: 田胜尼 (1971 年生), 男, 博士; 通讯联系人: 彭少麟; E-mail: kspsl@zsu.edu.cn

土壤交错区。样品采集时间为 2004 年 8 月。选好植株，采集 2~3 片新鲜叶片放入装有硅胶的封闭塑料袋中，待硅胶颜色变红时，重新更换新硅胶，以便叶片尽快干燥，供 DNA 提取用。有关样品采样信息如表 1 所示。

1.3 PCR 扩增、条件优化和检测

ISSR 引物购于加拿大哥伦比亚大学。对 ISSR

反应体系进行优化，优化后的反应体系如表 2 所示。扩增反应在美国 MJ 公司 PTC-100 扩增仪进行。PCR 扩增条件：95℃预变性 5 min，94℃变性 45 s，50~55℃复性 45 s（依引物不同而改变），72℃延伸 45 s，35 个循环之后 72℃反应 10 min。PCR 扩增产物在 $w=1.5\%$ 琼脂糖电泳分离，EB 染色后在 KODAK 凝胶成像系统观察并拍照。

表 1 6 个白茅居群样地特征¹⁾
Tab. 1 The character of the six *I. cylindrica* population sites

居群代号	经纬度		居群地点	多度	植被状况	采样数
HF	31°51'N	117°18'E	合肥郊区荒野	4	自然植被良好，盖度 80%~100%	30
WGL	30°56'N	117°48'E	铜陵五公里铜尾矿场	4	主要为自然定居草本植物，人工栽植少量柳树，盖度约 70%	30
TGS	30°56'N	117°48'E	铜陵铜官山铜尾矿库	5	自然定居草本植物，盖度约 75%	30
SZS	30°56'N	117°48'E	铜陵狮子山铜尾矿库	5	自然定居草本植物，盖度约 50%	30
YS	30°31'N	117°01'E	安庆月山铜尾矿库	5	人工复垦栽培及自然定居有草本植物，人工栽植少量柳树，盖度约 70%	30
HSL	30°39'N	117°28'E	池州黄山岭铅锌尾矿库	3	自然定居少量草本植物，盖度 5%	30

1) 多度 5 表示极丰富，4 表示丰富，3 表示不常见

表 2 白茅 ISSR 扩增反应体系
Tab. 2 The ISSR amplification system of *I. cylindrica*

成份	10× Buffer	MgCl ₂ 25mol/L	DNTP 2.5mol/L	Primer 20pmol/μL	EX Taq 5U	Template 10ng/μL	H ₂ O	总体积 μL
体积/μL	1.0	1.2	0.8	0.4	0.1	1	5.4	10

1.4 数据处理与分析 在电泳图谱上每一 DNA 片段被看作一个可区分的分子标记，代表引物的结合位点。同一标记位点有扩增带者记作 1，没有扩增带作 0。选取长度在 200~1700 bp 并且可重复的 DNA 带记录分析。用 POPGENE1.31 分析软件对整个居群和单个居群遗传多样性进行参数分析^[8]，分别计算了多态点百分率 (PPB, percentage of polymorphic bands)、居群总的遗传多样性 (H_t)、居群平均遗传多样性 (H_s)、群体的遗传分化系数 ($G_{st}=1-H_s/H_t$)、单个居群 Nei 基因多样性 (h) 和香农信息指数 (I)、Nei 遗传距离 (GD) 和遗传一致度 (GI)。用 AMOVA 1.55 软件分析白茅种群间和种群内的遗传差异^[9]。个体基因型之间的差异用 $(1-S)$ 来衡量， S 为 Nei 和 Li 相似性系数^[10]，由下式得出：

$$S = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$$

其中 N_{AB} 为两基因型共有扩增带， N_A 为基因型 A 拥有的扩增带， N_B 为基因型 B 拥有的扩增

带^[17-18]。基于 Nei 距离，用 MEGA1.01 对白茅群体进行 UPGMA 聚类分析^[11]，构建树状图，用 GenAEx 软件对 6 个白茅居群 180 个样本进行 PCA 分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选结果

从 100 个引物中筛选出 10 个扩增带多、多态性高、重复性好的引物。各引物的扩增结果如表 3 所示。10 个引物共扩增 139 条带，其中多态性带 132，多态位点百分比为 94.96%。各引物扩增带数和片段大小及多态百分比如表 3 所示，其中 811 引物扩增带数最多，有 18 条，其它引物多在 12 条到 17 条之间。

2.2 6 个居群内的遗传多样性分析

表 4 为各单个居群遗传多样性、香农信息指数和多态位点百分比以及整体居群的遗传多样性、香农信息指数和多态位点百分比。从表 4 中可知，

6个白茅居群总的遗传多样性为 0.312 5 香农信息指数为 0.472 1。整个居群的多态位点百分率达到 94.96%。在 6个居群中, 位于非尾矿废弃地合肥白茅居群 (HF) 遗传多样性最高, 为 0.256 8 香农指数 0.393 5 多态位点百分比 82.01%, 也高出其它尾矿废弃地的白茅居群。在 4个铜尾矿废弃地中, 遗传多样性指数和香农信息指数均比对照组合肥居群低, 说明由于铜尾矿不良环境的胁迫,

导致白茅种遗传多样性下降。在 5个金属尾矿废弃地的白茅居群中, 铜官山尾矿居群遗传性多样性香农指数最高, 接近于对照居群的遗传多样性及香农指数, 这可能是由于铜官山尾矿库停止时间较久, 有较多个体的缘故。黄山岭铅锌尾矿废弃地白茅居群遗传多样性、香农指数和多态位点百分比最低, 分别为 0.199 7、0.298 7和 57.55%。这说明铅锌尾矿废弃地对白茅居群选择性最强, 只有少量特殊

表 3 ISSR 反应引物及扩增结果¹⁾
Tab. 3 The ISSR primers and their sequences amplification results

引物	序列 (5' - 3')	总带数	片段大小	多态带	多态百分率
807	AGAGAGAGAGAGAGT	12	300 - 1200bp	10	83.33%
808	AGAAGAGAGAGAGAGG	12	400 - 1500bp	11	91.66%
810	GAGAGAGAGAGAGAT	17	250 - 1700bp	17	100%
811	GAGAGAGAGAGAGAC	18	200 - 1600bp	15	83.33%
815	CTCTCTCTCTCTCTG	10	320 - 1500bp	8	80%
825	ACACACACACACACT	13	380 - 1300p	12	92.3%
826	ACACACACACACACC	13	350 - 1500bp	13	100%
836	AGAGAGAGAGAGAGYA	17	200 - 1200bp	14	82.35%
842	GAGAGAGAGAGAGAYG	13	200 - 1100bp	12	92.3%
864	ATGATGATGATGATGATG	13	400 - 1300bp	11	84.61%

1) Y=(G T)

基因型的个体才能在铅锌尾矿废弃地正常。这与野外调查时, 白茅居群只有小面积的分布结果相一致。
从整个白茅居群的遗传多样性来看, 白茅具有

较高的遗传多样性, 这可能是白茅具有对不良环境较强适应能力, 成为铜尾矿废弃地上优势物种的原因。

表 4 6 个白茅居群的遗传多样性变化¹⁾
Tab. 4 Genetic variability of six *I. cylindrical* populations

样地	Nei遗传多样性 (H)	香农信息指数 (I)	多态位点百分比 P(%)
HF	0.2568(0.1715)	0.3935(0.2390)	82.01%
WGL	0.2042(0.1871)	0.3147(0.2632)	71.22%
TGS	0.2547(0.1787)	0.3888(0.2471)	80.58%
SZS	0.2004(0.1887)	0.3085(0.2653)	69.06%
YS	0.2433(0.1970)	0.3648(0.2755)	74.82%
HSL	0.1997(0.2012)	0.2987(0.2875)	57.55%
Mean	0.2265(0.0279)	0.3448(0.0425)	72.54%
Total	0.3125(0.0248)	0.4721(0.2039)	94.96%

1) 括号内为标准差 (St. Dev)

2.3 白茅居群遗传结构及遗传分化

根据总的遗传多样性 (Ht) 和居群内遗传多样性 (Hs) 计算出居群的遗传分化水平。POPOGENE软件分析结果表明, 白茅居群间的遗传分化系数 G_{st}为 0.2753。即在总的遗传变异中,

27.53%的遗传分化位于居群间, 72.47%遗传分化位于个体内。AMOVA 分子方差分析发现, 30.00%的遗传变异发生在居群间 (P<0.002), 70.00%遗传分化位于居群内。

表 5 白茅居群的 Nei遗传一致性和遗传距离¹⁾
Tab. 5 Nei's genetic identity and genetic distance between *I. cylindrica* populations

居群代号	HF	WGL	TGS	SZS	YS	HSL
HF	* * * *	0.8613	0.8772	0.8664	0.8712	0.8712
WGL	0.1493	* * * *	0.9087	0.8190	0.8759	0.8742
TGS	0.1310	0.0957	* * * *	0.8580	0.8949	0.8570
SZS	0.1434	0.1996	0.1531	* * * *	0.8658	0.8338
YS	0.1378	0.1325	0.1110	0.1441	* * * *	0.8713
HSL	0.1379	0.1345	0.1543	0.1818	0.1377	* * * *

1) 斜线右上方为各居群的遗传一致性，斜线左下为各居群之间的传距离

为了进一步说明白茅居群间的遗传关系，利用 POPOGENE 软件计算出 6 个白茅居群的遗传距离和遗传一致度，结果见表 5 所示。从表 5 可以看出，黄山岭铅锌尾矿与狮子山铜尾矿白茅居群之间遗传距离最大，达到 0.1818，而五公里白茅居群与铜官山白茅居群之间的遗传距离最小。尾矿地金属类型不同，居群间的遗传多样性差异不同，黄山岭铅锌尾矿与其它尾矿之间差异较大，而铜尾矿之间居群差异较小。根据居群间的遗传距离，利用 MEGE1.1 软件就 6 个居群遗传距离进行聚类分析，得到树状如图 1 所示。

从图 1 中可以看出，6 个居群分为 3 大组。铜陵五公里、铜官山和安庆月山铜尾矿废弃地的 3 个居群聚成一组，对照组合肥居群和黄山岭铅锌尾矿的居群聚成一组。铜陵狮子山铜尾矿上的白茅单独聚为一组。

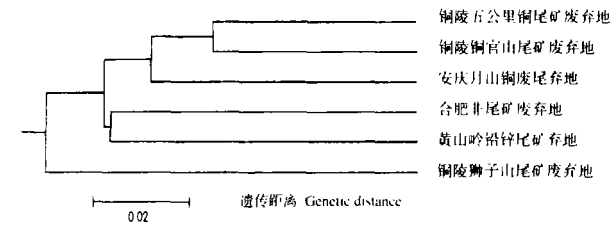


图 1 白茅 6 个居群的 Nei 遗传距离 UPGMA 树状图
Fig. 1 UPGMA dendrogram of Nei's distances among *I. cylindrica* populations

基于居群个体间的遗传距离，用 GenA lEx 软件对 6 个白茅居群 180 个样本进行 PCA 分析 (Principal coordinate analysis)，其各个体的遗传距离关系如图 2 所示。从图 2 可以看出，同一居群的个体相互聚集在一起，不同居群之间遗传结构存在分化。其中铜官山与月山两铜尾矿两居群个体遗传分化较小，狮子山、铜官山黄山岭居群的遗传结构分化较大。在主成分分析图中，黄山岭居群有几个体与合肥白茅居群个体之间距离较近，这可能与黄山

岭铅锌尾矿地上因白茅居群分布面积小，有些个体采集于尾矿与正常土壤交错区的缘故，遗传结构分化不明显所致。

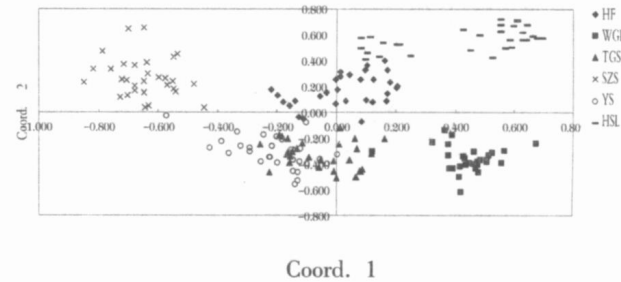


图 2 白茅居群的主分量分析
Fig. 2 Principal Coordinates analysis is of *I. cylindrica* populations

3 讨论

白茅是一种多年生的阳生草本植物，具有地下根状茎，能进行无性生殖和有性生殖。白茅具抗旱、耐贫瘠的能力，是荒地、山坡等废弃地先锋植物，有良好保持水土流失能力，在我国南方地区分布广泛^[12]。在群落的演替中，特别是不良的环境下，白茅往往是群落的先锋种和建群种。野外调查发现，金属尾矿废弃地对植物的自然定居生长产生严重的抑制作用。尾矿废弃地停放多年堆置，仍然寸草不生，许多木本植物种子如马尾松 *Pinus massoniana* 等在尾矿萌发后，很快死亡。这与尾矿废弃地金属含量高，营养元素如 N、P、K 以及有机质含量极低，表层不稳定、风蚀、水蚀严重、持水肥能力差等因素制约因素有关。而白茅是铜尾矿废弃地和铅锌尾矿废弃地自然定居物种之一，也是铜尾矿和铅锌尾矿废弃地上定居的优势种。白茅在尾矿废弃地的入侵和定居，减轻了尾矿给周边地区带来的环境污染，改善了基质的理化性质，同时为新的物种在尾矿上定居提供了小环境，加速尾矿废

弃地植物群落的演替。从我们的研究结果来看, 白茅可在尾矿废弃地定居, 与其具有较高遗传多样性有明显的关系。Grant^[13] 认为一个物种的进化潜力和抵制不良环境的能力取决于遗传多样性水平的高低。Nybom 和 Bartish^[15] 对一年生, 短命多年生及长命多年生的遗传多样性 (RAPD 结果) 进行了归纳, 表明一年生草本植物的遗传多样性为 0.125 短命多年生的草本植物为 0.207 多年生草本植物的遗传多样性为 0.242 本研究针对安徽地区 6 个白茅居群的遗传多样性发现, 总的遗传多样性为 0.312 5 高于生活史相同的多年生草本遗传多样性的遗传水平。对于任何一个物种来说, 其遗传多样性越丰富, 对环境变化的适应能力就越强, 就越容易扩展其分布范围和开拓新的生存空间。在尾矿废弃地定居植物来说, 物种应有较高的遗传多样性, 才能拓展到尾矿废弃等新的环境。在金属尾矿废弃地上, 植物自然定居受到抑制, 这可能与定居的物种本身遗传多样性的较低有关。因此在尾矿废弃地复垦中, 通过自然定居的物种调查和遗传结构的研究, 筛选一些遗传多样性高的物种用于铜、铅锌尾矿废弃地复垦。

4 结 论

(1) 白茅有较高的遗传多样性, 总的遗传多样性达到 0.312 5 高于同类生活型的遗传多样性, 这可能是白茅分布广, 能在铜尾矿和铅锌尾矿废弃地定居的主要原因之一。

(2) 由于尾矿环境的胁迫, 定居尾矿废弃地上的白茅居群的遗传多样性都发生下降, 表现为铜尾矿废弃地白茅居群均低于对照组, 铅锌尾矿的白茅居群遗传多样性最低。

(3) 从聚类分析和主分量分析可以看出, 在不同金属尾矿废弃地环境条件下, 白茅居群发生明显的遗传分化。这一方面可能是生境对物种的选择作用和物种在不环境条件胁迫下相互适应的结果。

通过研究, 我们认为在尾矿废弃地复垦中, 应根据不同的金属类型的尾矿来选择合适的居群和物种, 以免造成事倍功半的效果。

参考文献:

[1] 田胜尼, 刘登义, 彭少麟, 等. 5 种豆科植物对铜尾矿的适应性研究[J]. 环境科学, 2004 25(3): 138 - 143

[2] 田胜尼, 孙庆业, 王峥峰, 等. 铜陵铜尾矿废弃地定居植物及基质理化性质的变化[J]. 长江流域资源与环境, 2005 14(1): 87 - 93

[3] ZIETKIEWICZ E, RAFAŁSKA I A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics 1994 20 176 - 78

[4] KOJIMA T, NAGAIKA T, NODA K. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers[J]. Theoretical Applied Genetics 1998 96 37 - 45

[5] PREVOST A, WILKINSON M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars[J]. Theoretical Applied Genetics 1999 98(1): 107 - 112

[6] DSHIR GUPTA V S, AGGARWAL R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus Oryza[J]. Theoretical Applied Genetics 2000 100 311 - 320

[7] DOYLE J J. DNA protocols for plants - CTAB total DNA isolation[M] // Hewitt G M, Johnston A, eds. Molecular Techniques in Taxonomy. Berlin: Springer-Verlag, 1991: 283 - 293

[8] YEH F C, YANG R C, BOYLE T, et al. POPGENE: the user friendly shareware for population genetic analysis[C]. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada, 1997

[9] EXCOFFIER L, SMOUSE P E, QUATRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genetics 131 1992 479 - 491

[10] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci(USA), 1985 76 5269 - 5273

[11] SUDHAR K, KOCHIRO T, NGRID B, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software[C]. Bioinformatics 2001

[12] PEAKALLI R, SMOUSE P E. Genetic Analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research[C]. Australian National University, Canberra, Australia, 2001

[13] 安徽植物志协作组编. 安徽植物志(第 5 卷) [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1992 317 - 318

[14] GRANT V. The Evolutionary Process: A Critical Study of Evolutionary Theory. Molecular Systematics[M]. 2nd ed. Sunderland: Sinauer, 1991 1 - 11

[15] NYBOM H, BARTISH I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants[J]. Evolution and Systematics 2000 3 93 - 114

Genetic Diversity of *Imperata cylindrica* Populations Colonizing on the Metal Tailings Waste Lands by ISSR Technique

TIAN Sheng-ni^{1,2}, WANG Zheng-feng¹, GAO San-hong³, HAO Yan-ni¹, PENG Shao-lin^{1,3}

(1. South China Botanical Garden Chinese Academy of Sciences, Guangdong Provincial

Key Laboratory of Digital Botanical Garden, Guangzhou 510650, China

2. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

3. School of Life Sciences, Sun Yat Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract The genetic diversities of six *I. cylindrica* populations were determined by ISSR technique. The sample materials were collected in Anhui province from four different copper tailings: one lead-zinc tailings waste land and the normal soil far away from mine areas. Out of 100 ISSR primers, 10 primers generated highly reproducible and stable DNA bands. Using these primers, 139 discernible DNA fragments were produced for the 180 samples of six *I. cylindrica* populations. The number of polymorphic loci was 132, and the percentage of polymorphic loci was 94.96%. The result of POPGENE analysis indicated the whole genetic diversity (H_t) of *I. cylindrica* was 0.3125, and the genetic diversity (H_s) among the populations was 0.2265. The genetic diversity (Shannon index) and percentage of polymorphic loci for the population growing on the normal soil were higher than other five populations on the metal tailings waste land. The results of AMOVA and PCA analysis indicated genetic differentiation had taken place significantly among the six populations colonizing ($\varphi_{st}=0.030$, $P<0.002$). From the results of this study, the high genetic diversity of *I. cylindrica* may contribute to colonize on the copper tailings and lead-zinc tailings.

Key words ISSR (Inter-simple sequence repeat); metal tailings waste land; *Imperata cylindrica*; genetic diversity