

基于 cpDNA *trnL-F* 序列数据分析海南陆均松种群的冰期后扩张*

苏应娟¹, 王 艇², 陈国培^{1,2}, 孙宇飞¹, 江 宇¹, 邓 锋¹, 王伯荪¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

(2. 中国科学院武汉植物园, 湖北 武汉 430074)

摘 要: 针对热带树种陆均松 *Dacrydium pierrei* de Laubenfels 分布在海南的 12 个天然种群进行取样, 测定了叶绿体 DNA (cpDNA) *trnL-F* 非编码区序列。序列长度介于 868~876 bp, 显示出长度多态性。碱基组成 A+T 含量较高, 百分比值为 64.17%~64.95%。通过统计简约算法共鉴定出 30 个单倍型。根据种群间分化度 F_{ST} ($=0.00$)、基因流 Nm (介于 1.92~2.50)、AMOVA (24.17% 的遗传变异发生在种群间, $P>0.05$) 以及邻接树中单倍型的分支式样, 发现海南的陆均松种群尚未发生遗传分化。另一方面, 依统计简约算法构建的单倍型网图具“星状”特征, 而且邻接树中多数单倍型合并于树的顶端。这些基因谱系结果提示海南陆均松种群在近期历史上发生过种群扩张。Tajima 的 D 检验和错配分析结果也支持这种推测。结合地质和古孢粉学证据, 认为残存于“避难所”的陆均松种群在全新世时, 伴随全球气候转暖, 在海南岛内可能实行了扩张。

关键词: 陆均松 *Dacrydium pierrei* de Laubenfels; cpDNA *trnL-F* 非编码序列; 单倍型; 遗传分化; 种群扩张

中图分类号: Q949.66+2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 02-0070-05

陆均松 *Dacrydium pierrei* de Laubenfels 是一种常绿乔木, 高可达 30 余 m, 在分类上被归入罗汉松科陆均松属 *Dacrydium* Solander ex G. Forster。陆均松属包括 21 种植物, 而陆均松是该属分布于我国的惟一代表^[1]。陆均松在我国的现代分布区很狭窄, 仅见于海南省中部以南山区, 例如, 尖峰岭、吊罗山、五指山及霸王岭等水湿条件优越的山地雨林, 并组成较优势植物种类成份。然而, 古孢粉学资料显示, 历史上在第三纪晚期 (距今 2 万~4 万 a 前) 陆均松曾分布到我国南方北纬 22°~24°附近, 比其现代分布北界要高出 3~5 个纬度; 直至 1.5 万年前, 由于晚大理盛冰期气候变冷和全球低海面所造成的古环境变化才导致陆均松退出华南大陆^[2]。因此, 陆均松是研究海南植物系统发育地理、热带林起源及区系组成的重要材料。可是, 由于过去 20 多 a 的过度砍伐, 其天然资源备受破坏, 现已被列为国家三级保护珍稀濒危植物。

研究濒危物种种群的遗传结构和地理分化不仅有助于更加深入地了解种群的形成、分布和扩散途径, 而且可以追溯历史事件对种群进化产生的影响^[3]。近年来, 基因谱系 (gene genealogy) 和合并理论 (coalescence theory) 的联合运用为在分子水平上探讨种群的遗传变异和分化进一步开辟出新的途

径^[4,5]。叶绿体 DNA (cpDNA) 非编码区序列已被经常用于分析植物种内系统发育、种群遗传结构及系统发育地理学问题。

本研究以陆均松现存于海南的天然种群为材料, 通过对 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列数据进行核苷酸多样性、中性检验和错配分布 (mismatch distribution) 以及系统发育地理分析, 研究了陆均松海南种群的遗传结构和近期历史上可能发生的事件。

1 材料和方法

1.1 植物材料

样本分别采自海南大吊罗海拔 960 m 种群 (DD), 吊罗后山海拔 938 m 种群 (LHA)、海拔 1 000 m 种群 (LHB) 及海拔 1 080 m 种群 (LHC), 白水岭海拔 610 m 种群 (BSA)、海拔 626 m 种群 (BSB) 及海拔 980 m 种群 (BSC), 和生长于霸王岭东四分水岭山脊海拔 1 000 m 处的种群 (FS)、老点小路海拔 1 050 m 处种群 (LD)、东三山脊海拔 1 100 m 处种群 (SS)、东三旧公路海拔 1 000 m 处种群 (SG) 及东四伐区路边海拔 1 000 m 处种群 (FQ)。采集的叶片材料立即用硅胶干燥, 运至实验室后 -20℃ 保存。

* 收稿日期: 2004-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170789, 30270153); 中国科学院“百人计划”项目 (05052903)

作者简介: 苏应娟 (1965 年生), 女, 副教授; 通讯联系人: 王艇; E-mail: tingwang@wbcas.cn

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取与 PCR 扩增反应 采用改进的十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB) 法^[6]。每 100 μL PCR 反应体积中包括: 50 mmol/L KCl; 10 mmol/L Tris-HCl; 1.5 mmol/L MgCl_2 ; 0.1% Triton X-100; dNTP 各 200 $\mu\text{mol/L}$; 模板用量为 50 ng; 2.0 单位 TaqDNA 聚合酶; 引物各 40 pmol。扩增 cpDNA *trnL-F* 非编码区引物采用 Taberlet 等的设计^[7], 引物 c: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTAC G-3', 引物 f: 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环; 末次循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测相对分子质量。

1.2.2 PCR 扩增产物直接测序 取 PCR 产物 5 μL 测序, 测序引物与 PCR 反应引物相同。

1.2.3 低熔点琼脂糖回收 PCR 产物与克隆测序 $w = 1.0\%$ 琼脂糖凝胶 1 $\times$ TAE 电泳 2 h (电压为 5 V/cm), 切下目的片段, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。回收所得 PCR 产物采用 pMD18-T Vector 试剂盒连接, 转化导入由大肠杆菌 DH-5 α 所制的感受态细胞中, 采用蓝白斑筛选法获得克隆。使用 PCR 法确认 T 载体中插入片段的大小, 鉴定阳性克隆。用阳性克隆提取质粒做模板, 应用 pMD18-T Vector 两端通用引物 M13F 和 M13R 在 ABI377 自动测序仪上测序。

1.3 数据分析

测定的 *trnL-F* 非编码区单倍型序列 GenBank 登录号为 AY534768 - AY534797。序列比对使用 Clustal X 软件^[8]完成。按照 Jobling 等^[9]的方法计算单倍型多样性 (h) 与核苷酸多样性 (D_j)。根据 Tajima^[10]的方法进行中性检验。错配分布检测采用 Rogers 和 Harpending^[11]的方法。利用 Templeton 等^[12]的统计简约算法 (statistical parsimony algorithm) 构建网图。使用 PHYLIP 软件包^[13]计算单倍型间的 Kimura 双参数遗传距离, 并进行邻接法 (Neighbor-joining Method) 分析。通过 Bootstrap 法检验重建分支的可信度。邻接法分析时选取日本黑松 *Pinus thunbergii* Parl. 作为外类群。种群内和种群间的基因流用每代雌性个体迁移数 (N_m) 估计, 该值可由公式 $F_{ST} = 1/(1 + 2N_m)$ 求出, 其中 N 是有效种群大小雌性数目, m 是雌性迁移率^[14]。选用 Arlequin 软件^[15]进行分子方差分析 (AMOVA), 计算种群内、种群间及不同地区间种群的变异方差分布。

2 实验结果

2.1 单倍型多样性与核苷酸多样性

陆均松 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列长度介于 868 ~ 876 bp 之间, 显示出长度多态性; 发生在位点 112 - 119 的插入导致 BSA01 和 SG02 的序列加长。碱基组成 A + T 含量较高, 其百分比介于 64.17% ~ 64.95% 之间, 许多非编码区和假基因序列都具此性质。通过统计简约算法共鉴定出 30 个 cpDNA *trnL-F* 单倍型。

陆均松 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列的单倍型多样性 (h) 与核苷酸多样性 (D_j) 见表 1。陆均松具高水平单倍型多样性 ($h = 0.821$)。各种群的单倍型多样性也较高 (h 值介于 0.545 ~ 0.909), 其中 FS 种群的单倍型多样性最低, BSB 和 LHB 种群单倍型多样性最高。陆均松整个种的核苷酸多样性 ($D_j = 0.00252$) 水平较低。各种群的 D_{ij} 取值介于 0.00070 ~ 0.00534, 其中 FS 种群的核苷酸多样性最低, SG 种群核苷酸多样性最高。

2.2 中性检验和错配分布

利用 Tajima D 检验所得负值 (-2.62202) 和零有极显著性差异 ($P < 0.001$), 这说明同零假设 (分子进化呈中性、种群处于平衡状态) 的预期相比, 稀有等位基因过量。

另外, 陆均松 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列的错配分布和基于突然扩张模型 (sudden expansion model) 预期的结果非常匹配 (图 1)。参差指数 (raggedness index) 较低, 并且和预期值没有显著差异 ($R = 0.022$, $P = 0.0899$)。

2.3 叶绿体 DNA 单倍型的系统发育

图 2 是利用统计简约算法由陆均松 *trnL-F* 非编码区单倍型构建出的网图。单倍型的分支式样呈现“星状”结构。单倍型 FS01 被鉴定为祖先型, 它在种群 FS、LD、SS、SG、FQ、LHA 及 LHC 中均有出现。绝大多数单倍型仅以 1 至 4 步突变与处在中心位置的 FS01 合并; 只有单倍型 BSA01 和 SG02 例外, 它们通过较长步长与 FS01 合并, 在位置上显得孤立。此外, 没有种群共有衍生型单倍型。

以日本黑松 *Pinus thunbergii* Parl. 为外类群对陆均松近缘种鸡毛松 *Podocarpus imbricatus* Bl.、百日青 *Podocarpus neriifolius* D. Don、罗汉松 *Podocarpus macrophyllus* (Thunb.) D. Don 和所有陆均松 *trnL-F* 非编码区单倍型进行邻接法分析发现, 陆均松单倍型序列组成一单系群并获 Bootstrap 值为 99% 的有力支持 (图 3)。除 BSA03, SS01 及 LHC01 外, 多数单倍型在树的顶端附近合并。没有一个来自同一种群的全部单倍型能组成单系群。对应于不同地点的分支混合分布, 显示其间存在有效基因流。

表 1 陆均松 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列的单倍型多样性 (h) 和核苷酸多样性 (D_{π})
Tab.1 Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (D_{π}) of cpDNA *trnL-F* noncoding sequences of *D. pierrei*

种群	地理位置	样本大小	单倍型多样性	核苷酸多样性
<i>D. pierrei</i>		138	0.821	0.00252 ± 0.00024
FS	109°13'E18°25'N	12	0.545	0.00070 ± 0.00022
LD	109°14'E18°26'N	10	0.800	0.00205 ± 0.00043
BSA	109°52'E18°41'N	10	0.889	0.00287 ± 0.00041
BSB	109°52'E18°41'N	12	0.909	0.00279 ± 0.00037
BSC	109°52'E18°41'N	12	0.545	0.00105 ± 0.00035
SS	109°15'E18°28'N	12	0.727	0.00140 ± 0.00035
SG	109°16'E18°27'N	10	0.889	0.00534 ± 0.00112
DD	109°54'E18°44'N	12	0.727	0.00105 ± 0.00023
FQ	109°14'E18°22'N	12	0.848	0.00244 ± 0.00043
LHA	109°51'E18°43'N	12	0.545	0.00105 ± 0.00035
LHB	109°51'E18°43'N	12	0.909	0.00524 ± 0.00068
LHC	109°51'E18°43'N	12	0.727	0.00210 ± 0.00065

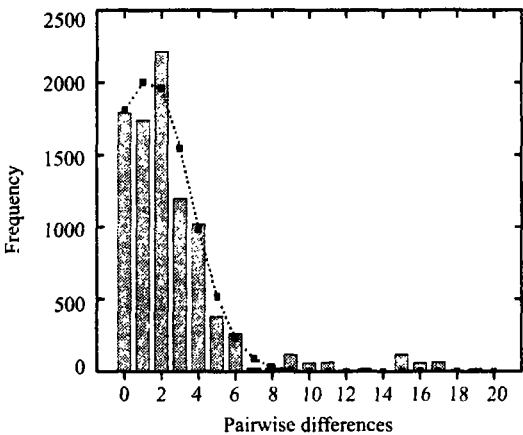


图 1 陆均松种群 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列的错配分布
Fig.1 Mismatch distribution across populations of *D. pierrei* based on cpDNA *trnL-F* noncoding sequences

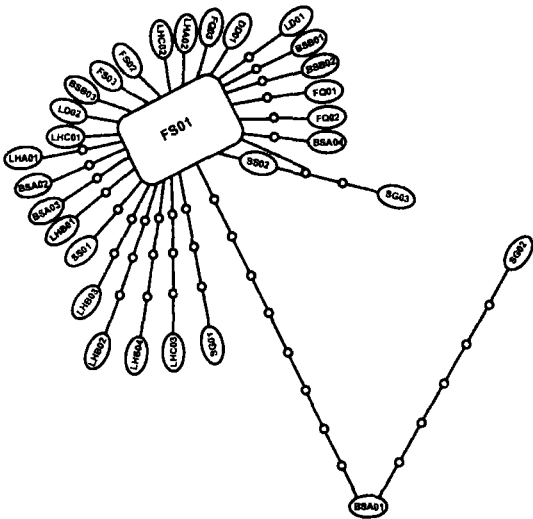


图 2 利用统计简约算法构建的陆均松 *trnL-F* 非编码区单倍型网图
Fig.2 Network relating haplotypes of cpDNA *trnL-F* noncoding regions in *D. pierrei* by statistical parsimony algorithm

2.4 种群遗传分化

从 DNA 歧义度的角度分析, 陆均松种群间 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列的核苷酸差异平均数和每位点核苷酸替换平均数分别介于 0.833 ~ 5.033 和 0.000 96 ~ 0.004 54; 种群 FS 同种群 BSC、DD 及 LHA 之间的歧义度最小, 而种群 SG 和 LHB 之间的歧义度最大。

根据陆均松 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列变异估算出的种群间分化度 F_{ST} 取值为 0.00、基因流 N_m 值介于 1.92 ~ 2.50, 而且种群间的 N_m 值和地理距离之间不存在显著相关性 ($r = 0.06$, $P = 0.778$)。基于 *trnL-F* 非编码区序列变异的 AMOVA 分析表明, 陆均松大部分 (75.83%) 遗传变异发生在种群内, 只有 24.17% 的遗传变异发生在种群

间 ($P > 0.05$)。

3 讨论

检测陆均松的种群遗传结构发现, 其分布于海南的种群间还未发生分化。这种推论得到种群间分化度 F_{ST} 基因流 N_m 及 AMOVA 数据的支持。邻接树的分支式样也显示种群间存在明显基因流。依统计简约算法求得的网图显示: 单倍型 FS01 属祖先型; 在所研究的 12 个种群中, 它为 FS、LD、SS、SG、FQ、LHA 及 LHC 等 7 个种群共有。但除此祖先型单倍型外, 陆均松种群不再共有衍生型单倍型, 说明所共有的祖先型单倍型可能代表的正是各种群来

源相同的组成部分^[16]。这些结果反映陆均松海南各种群之间有着密切的遗传联系，种群遗传分化程度低。陆均松不仅拥有远交繁育系统^[1]，而且还具有长距离传递基因流的潜力；它的花粉在海南山地雨林表土中普遍存在，是山地雨林中含量最高的花粉种类之一^[2,17]。这些生物学特性可能是导致其种群分化程度低的重要原因^[18]。

陆均松的海南种群中检测到高水平单倍型多样性 ($h = 0.821$) 和低水平核苷酸多样性 ($D_p = 0.00252$)。这是种群经由较小的有效种群大小发生过快速扩张的“标识”^[19]。陆均松 *trnL-F* 单倍型的系统发育地理式样具“星状”特征，即其他单倍型大多以较短的枝长同中央单倍型合并 (图 2)。这种相对简单的式样表示，种群在遇到适宜的气候环境条件时曾经发生过扩张；扩张后的种群因为还未能获得足够的时间建立更加复杂的结构故而呈现“星状”^[4]。邻接树中，多数单倍型在树的顶端或接近顶端接合 (图 3)，同样提示合并事件主要发生在相

对较近的时期。此外，Tajima 的 D 检验和 *trnL-F* 非编码区序列间的差异频率分布也都支持所研究的陆均松种群近期经历过种群扩张。地质和古孢粉学证据表明，经历晚玉木盛冰期后，陆均松虽然已完全在华南大陆消失，但是它们却得以在海南残存。盛冰期时，海南海拔 500 m 以上的山区仍能提供适应陆均松生长的气温条件，成为其“避难所”。^[2] 结合本研究结果可以推测，残存于“避难所”的陆均松种群在全新世时，伴随全球气候转暖，实行了种群扩张。垂直方向，陆均松种群可以向更高海拔迁移；水平方向，扩张范围局限在海南岛内，因为冰后期海平面的快速上升导致海南和大陆分离，海水阻隔使得陆均松无法再返回华南大陆。

近年来，不少研究开始尝试应用分子手段来分析植物冰期后所经历的迁移对现有种群遗传变异格局的影响^[20]。乔木由于每代寿命相对很长，它们对上述问题的探讨可能更具特殊价值^[21]。但是，这方面针对热带树种的工作却鲜见报道。陆均松是热带雨林优势植物，本文以它为材料所进行的研究显示，分子系统发育地理方法能够为揭示热带地区乔木的种群遗传结构和进化历史提供新资料。

参考文献：

- [1] FU L G, LI Y, MILL R R. Cycadaceae through Fagaceae. // Wu, et al, eds. Flora of China Vol. 4 [M]. Beijing: Science Press and St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 1999: 78 - 86.
- [2] 郑卓. 晚第四纪陆均松在中国南方的分布[J]. 植物学报, 1991, 33(2): 130 - 139.
- [3] LOVELESS M D, HAMRICK J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations [J]. Ann Rev Ecol Syst, 1984, 15: 65 - 95.
- [4] 苏应娟, 王艇, 郑博, 等. 根据 cpDNA *trnL-F* 非编码区序列变异分析黑桫欏海南和广东种群的遗传结构与系统地理[J]. 生态学报, 2004, 24(5): 914 - 919.
- [5] CASTELLOE J, TEMPLETON A R. Root probability for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory [J]. Mol Phylogenet Evol, 1994, 3: 102 - 113.
- [6] WANG T, SU Y J, LI X Y, et al. Genetic structure and variation in the relict populations of *Alsophila spinulosa* from southern China based on RAPD markers and cpDNA *atpB-rbcL* sequence data [J]. Hereditas, 2004, 140: 8 - 17.
- [7] CHIANG T, CHIANG Y C, CHEN Y J, et al. Phylogeography of *Kandelia candel* in east Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs [J]. Mol Ecol, 2001, 10: 2697 - 2710.
- [8] 苏应娟, 王艇, 杨维东, 等. 罗汉松属植物 DNA 的提取和 RAPD 分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(4): 13 - 18.
- [9] TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al. Universal

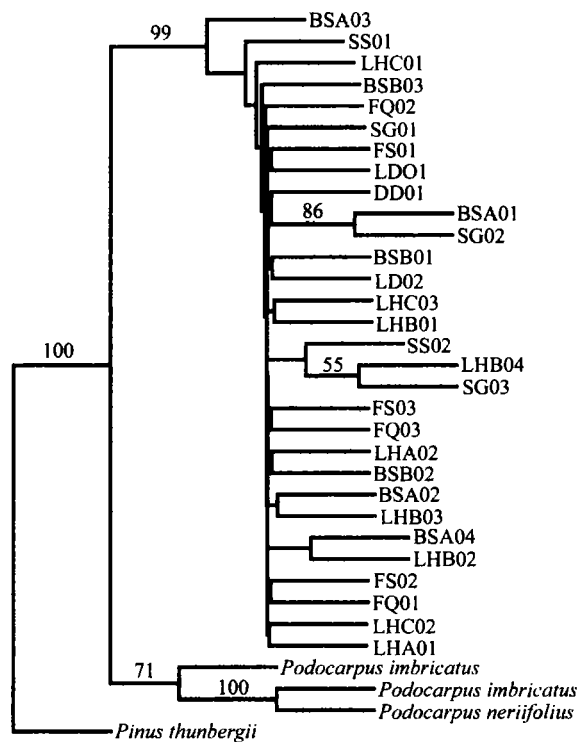


图3 基于陆均松单倍型及其近缘种鸡毛松、百日青和罗汉松的 *trnL-F* 非编码区序列，以日本黑松为外类群构建的的邻接树

Fig.3 Neighbour-joining tree based on cpDNA *trnL-F* noncoding sequences of haplotypes of *D. pierrei* and its closely related species, *Podocarpus imbricatus*, *P. neriifolius*, and *P. macrophyllus*, rooted using *Pinus thunbergii* as outgroup

- primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. *Plant Mol Biol* 1991, 17: 1105 – 1109.
- [10] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIK F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 24: 4876 – 4882.
- [11] JOBLING M A, HURLES M E, TYLER-SMITH C. Human evolution genetics[M]. New York: Garland Science, 2004.
- [12] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. *Genetics*, 1989, 123: 585 – 595.
- [13] ROGERS A R, HARPENDING H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences[J]. *Mol Biol Evol*, 1992, 9: 552 – 569.
- [14] TEMPLETON A R, CRANDALL K A, SING C F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation[J]. *Genetics*, 1992, 132: 619 – 633.
- [15] FELSENSTEIN J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3. 57. Computer program, University of Washington, 1995.
- [16] SLATKIN M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations[J]. *Evolution*, 1993, 47: 264 – 279.
- [17] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- [18] HWANG S Y, LIN T P, MA C S, et al. Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation[J]. *Mol Ecol*, 2003, 12: 2689 – 2695.
- [19] 傅立国, 金鉴明. 中国植物红皮书—稀有濒危植物[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [20] LOVELESS M D, HAMRICK J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations[J]. *Annual Rev Ecol Syst*, 1984, 15: 6 – 95.
- [21] AVISE J C. Phylogeography[M]. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [22] NEWTON A C, ALLNUT T R, GILLIES A C M, et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species[J]. *Trend Ecol Evol*, 1999, 14: 140 – 145.
- [23] DAWSON I K, SIMONS A J, WAUGH R, et al. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays[J]. *Heredity*, 1995, 74: 10 – 18.

Postglacial Population Expansion of *Dacrydium pierrei* (Podocarpaceae) in Hainan, Southern China, Based on cpDNA *trnL-F* Noncoding Sequence Data

SU Ying-juan¹, WANG Ting², CHEN Guo-pei^{1,2}, SUN Yu-fei¹, JIANG Yu¹, DENG Feng¹, WANG Bo-sun¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

2. Wuhan Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: Chloroplast DNA (cpDNA) *trnL-F* noncoding sequences of individuals of a tropical coniferous species, *Dacrydium pierrei*, collected from twelve natural populations located in Hainan, southern China, were determined. Sequence length varied from 868 bp to 876bp, showing length polymorphism. Base composition had a high A + T content of 64.17% ~ 64.95%. Thirty haplotypes were identified based on statistical parsimony algorithm. Populations of *D. pierrei* in Hainan are lack of genetic differentiation. Such a deduction was supported by observed F_{ST} values ($= 0.00$), high values for Nm (ranging from 1.92 to 2.50), AMOVA (24.17% of molecular variance attributed to difference among populations, $P > 0.05$) as well as the branching structure in Neighbour-Joining (NJ) tree constructed from haplotypes. A “star-like” pattern was exhibited in the network of *trnL-F* haplotypes established by statistical parsimony algorithm, and majority of the haplotypes coalesced near the tips in NJ tree. Gene genealogies of cpDNA haplotypes proposed a recent population expansion of *D. pierrei* in Hainan, which was further lent support by the results from Tajima’s D test and mismatch distribution analysis. Our data in junction with geological and palynological evidences showed that in the Holocene, due to global warming, refuge populations of *D. pierrei* in Hainan might experience a range expansion.

Key words: *Dacrydium pierrei*; cpDNA *trnL-F* noncoding sequence; haplotype; genetic differentiation; population expansion