

中国特有极度濒危植物猪血木的保护遗传学研究^{*}

王 艇¹, 苏应娟¹, 叶华谷², 欧阳蒲月¹, 江 宇¹,
孙宇飞¹, 陈国培¹, 邓 锋¹, 张宏达¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650)

摘 要: 应用 RAPD 标记分析了广东阳春八甲镇猪血木 *Euryodendron excelsum* H. T. Chang 种群全部 14 个个体的遗传变异和进化关系。23 个引物共检测到 156 个位点, 其中多态位点 95 个, 多态位点比率 60.90%。根据所得数据求出的观察等位基因数为 1.609 0、有效等位基因数为 1.347 1、Nei 基因多样性为 0.199 3、Shannon 多样性指数为 0.153 4。猪血木还保留有比较丰富的遗传多样性。对 Jaccard 相似性系数用 UPGMA 法进行聚类分析表明, 猪血木个体明显地分为 2 个亚群, 其中 2 号个体同其他成员的遗传关系疏远。RAPD 谱带表型的主成分分析 (PCA) 支持聚类分析结果。根据这些结果讨论了种群的管理和保护策略。

关键词: 猪血木 *Euryodendron excelsum* H. T. Chang; 种群变异; RAPD 标记; 保护策略

中图分类号: Q943; Q347 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 01-0068-05

猪血木 *Euryodendron excelsum* H. T. Chang 为第三纪孑遗植物, 在分类学上隶属于山茶科 Theaceae 猪血木属 *Euryodendron*, 是我国特有的单属种。猪血木属高大乔木, 它具有两性花及被毛的花药, 花柱与柱头简单、不分裂, 芽体极短小, 苞片细小、绝不为长筒形, 叶排成多列, 边缘具锯齿, 脉序网状。张宏达 1963 年根据其形态结构特征建立了猪血木种及猪血木属^[1-3]。该植物特产于广东和广西, 但由于生态环境的破坏, 它目前在广西已绝迹^[4]。它在广东的现有分布范围也极其狭窄, 仅存于阳春八甲镇。猪血木已被列为国家二级保护濒危植物^[3]; 然而, 参照国际保护协会 (IUCN) 的界定标准, 它实际上属于极度濒危物种^[6]。

形态学方面, 猪血木兼具红淡比属 *Cleyera* 花和枹属 *Eurya* 叶的特征, 故而对研究这些类群的亲缘关系以及厚皮香亚科 Ternstroemoideae 的系统发育具有重要意义。另外, 猪血木的经济价值也很明显, 其木材纹理细而坚硬, 色泽鲜艳, 是家具和建筑的良好用材^[7]。因此, 如何拯救这一中国特有濒危植物已成为许多人关心的课题。了解濒危物种的遗传变异水平可以为制定保护策略, 实施有效管理, 直至为最终建立可自我持续发展的种群提供必需的基础资料^[8]。遗憾的是, 针对猪血木现存种群的遗传变异分析迄今未见报道。

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术现已成为在种内水平上检测物种分子多态性的常规方法。它方法简便、成本较低、无需预先知道特定旁侧区域的序列信息, 而且理论上它可以产生无限多的分子标记从而鉴定出更多多态位点^[9-11]。

对珍稀濒危物种的研究 RAPD 还具有一些潜在优势, 例如, 由于对 DNA 样品的用量较低, 即使要对濒危物种的整个基因组都进行检测, 所需的组织、细胞材料仍很有限, 不至于对个体造成伤害。此外, RAPD 片段属于选择上呈中性的标记^[12], 这样群体遗传学上已经建立的许多理论和模型都可直接用于 RAPD 数据的解析, 而不必顾虑选择的效应^[13]。当然, RAPD 也有局限性。技术上, 其带型可重复性欠佳; 此问题可以通过反应条件的预研究得到较好控制。另外, RAPD 作为显性标记在数据统计分析方面带来问题, 但已被 Stewart 和 Excoffier 建立的方法较好解决^[14]。

《中国珍稀濒危植物》记录猪血木在广东阳春八甲镇仅残存 2 株^[13]。但到 2000 年, 仅存的 2 株又有 1 株死亡^[4]。幸运的是, 叶华谷等在再赴广东阳春的调查中, 在八甲镇又新发现了 4 株猪血木^[4]。近几年来, 生态环境的逐步改善可能使猪血木在当地的繁殖和更新压力得到一定缓解, 猪血木的个体数目有了进一步增加。在开展本研究时, 我

* 收稿日期: 2004-06-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271094); 留学回国人员科研启动基金 (外教司留 [2003] 406 号)

作者简介: 王艇 (1969 年生), 男, 副教授; E-mail: jsswt@zsu.edu.cn

们在阳春八甲镇共发现 14 株猪血木个体。运用 RAPD 标记, 对这所有 14 个个体的分子遗传变异水平和式样进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

分别采摘分布于广东阳春八甲镇的 14 个猪血木个体的新鲜叶片, 于-20℃保存。

1.2 DNA 提取

采用改进的十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB) 法^[6]。测定紫外光吸收以确定 DNA 浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。

1.3 引物的筛选

从上海生工公司合成的 137 个 10 碱基随机寡核苷酸引物中筛选出 50 个有扩增产物的引物, 完成其中 23 个扩增产物稳定、重复性好的引物的 RAPD 扩增, 引物序列见表 1。

表 1 RAPD 分析的随机引物及序列
Tab 1 Random oligonucleotide primers and their sequences used for RAPD analysis

引物	序列 (5'→3')	引物	序列 (5'→3')
S17	AGGGAACGAG	S85	CTGAGACGGA
S103	AGACGTCCAC	S120	GGGAGACATC
S121	ACGGATCCTG	S151	GAGTCTCAGG
S155	ACGCACAACC	S178	TGCCCAGCCT
S236	ACACCCCAAC	S240	CAGCATGGTC
S258	GAGGTCCACA	S312	TCGCCAGCCA
S345	CTCCATGGGG	S346	TCGTTCCGCA
S397	AGCCTGAGCC	S463	CTGATACGCC
S471	AACGCGTCGG	S501	TGCGGGTCCT
S506	GTCTACGGCA	S512	ACAGGTGCGT
S1017	CAGTGGGGAG	S1512	CTCCCAGGGT
S1518	GTGGGCATAC		

1.4 RAPD 扩增与检测

经预实验优化条件后确定反应体系为: 总体积 25 μL, 其中 10×PCR 缓冲液 (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris HCl, 1.0% Triton X-100, 20 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL, 引物 (1.5 μmol/L) 0.3 μL, dNTPs (0.2 mmol/L) 0.5 μL, 模板 2 μL (25 ng), Taq 酶 0.2 μL (0.5U), 反应混合物用 20 μL 石蜡油覆盖。Taq 酶和主要试剂购自上海生工公司。扩增条件: 94℃ 200 s 预变性; 94℃ 60 s, 36℃ 60 s; 72℃ 120 s, 40 个循环; 72℃ 延伸 10 min。所有反应在 Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer Corporation) 上进行。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝

胶电泳检测, 紫外灯下观察、照相。

1.5 数据分析

在某一特定位点上, 若扩增片段出现的频率小于 0.99, 则此位点称为多态位点。多态位点比率即在所有检测位点中多态位点所占的比例。

Shannon 多样性指数计算公式为:

$$H = - \sum p_i \ln p_i$$

其中 p_i 为表型频率, 即某一扩增带在第 i 个种群中出现的频率。

利用 PopGen32^[17] 软件计算观测等位基因数、有效等位基因数、基因多样性指数。

应用 NTSYSpc2 软件^[18] 进行聚类分析和主成分分析 (PCA)。

2 结果

用 23 个随机引物对阳春八甲镇猪血木种群 14 个个体的基因组 DNA 进行的 RAPD 分析显示 (图 1), 每个引物检测到的位点数在 3~9 个之间, 扩增片段长度介于 150~3 000 bp。23 个引物共检测到 156 个位点, 平均每个引物检测到的位点数为 6.78。23 个引物中, 除引物 S155、S1512 外, 其余 21 个引物均能扩增出多态产物, 总共检测到 95 个多态位点; 多态位点所占比率为 60.90%。

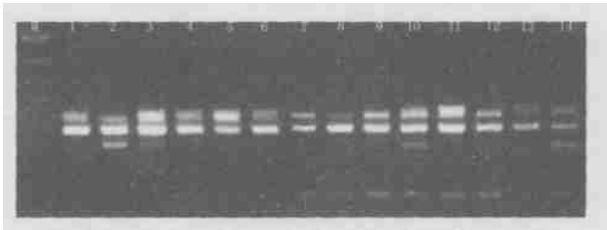


图 1 用引物 S17 对猪血木个体 (1—14) 扩增出的 RAPD 带型

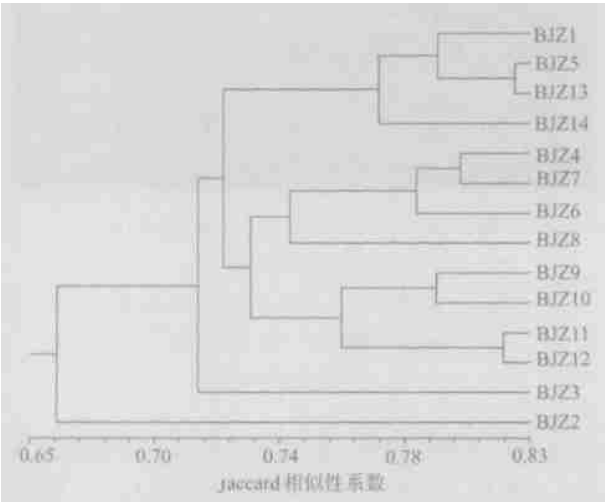
Fig. 1 RAPD profile of *Euryodendron excelsum* samples obtained with primer S17
M: 100 bp ladder marker

根据所有引物检测到的数据求出的观察等位基因数为 1.609 0、有效等位基因数为 1.347 1、Nei 基因多样性为 0.199 3、Shannon 多样性指数为 0.153 4。至于由各引物扩增出的条带分别估算的相应值见表 2。

对 Jaccard 相似性系数用 UPGMA 法进行聚类分析的结果 (图 2) 表明, 阳春八甲镇的猪血木个体明显地分为 2 个亚群, 其中 2 号个体同其他成员的遗传关系疏远。

表 2 猪血木种群的基因多样性
Tab 2 Gene diversity of the *Eurydendron excelsum* population

引物	位点数	多态位点数	多态位点比率/%	观察等位基因数	有效等位基因数	Nei 基因多样性	Shannon 指数
S17	9	6	66.67	1.6667	1.3838	0.2269	0.2110
S85	9	8	88.89	1.8889	1.3982	0.2370	0.2221
S103	7	3	42.86	1.4286	1.2133	0.1286	0.1214
S120	6	2	33.33	1.3333	1.3024	0.1585	0.0694
S121	7	6	85.71	1.8571	1.4031	0.2427	0.2221
S151	6	2	33.33	1.3333	1.0717	0.0553	0.0911
S155	3	0	0.00	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
S178	9	9	100.00	2.0000	1.6729	0.3776	0.2738
S236	6	2	33.33	1.3333	1.3026	0.1583	0.0934
S240	8	4	50.00	1.5000	1.3104	0.1788	0.1262
S258	5	2	40.00	1.4000	1.1674	0.1141	0.1282
S312	5	4	80.00	1.8000	1.5195	0.2859	0.1260
S345	8	6	75.00	1.7500	1.5123	0.2997	0.2541
S346	8	8	100.00	2.0000	1.5113	0.2869	0.1980
S397	7	2	28.57	1.2857	1.2099	0.1205	0.0555
S463	5	4	80.00	1.8000	1.3102	0.2021	0.2141
S471	9	8	88.89	1.8889	1.3629	0.2072	0.1980
S501	8	5	62.50	1.6250	1.3914	0.2148	0.1522
S506	7	3	42.86	1.4286	1.1792	0.1075	0.1147
S512	5	3	60.00	1.6000	1.5403	0.2843	0.1097
S1017	8	4	50.00	1.5000	1.3246	0.1792	0.1305
S1512	4	0	0.00	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
S1518	7	4	57.14	1.5714	1.3727	0.2165	0.1277
所有引物	156	95	60.90	1.6090	1.3471	0.1993	0.1534



成分（PC1、PC2 及 PC3）共代表着 54.7% 的方差。

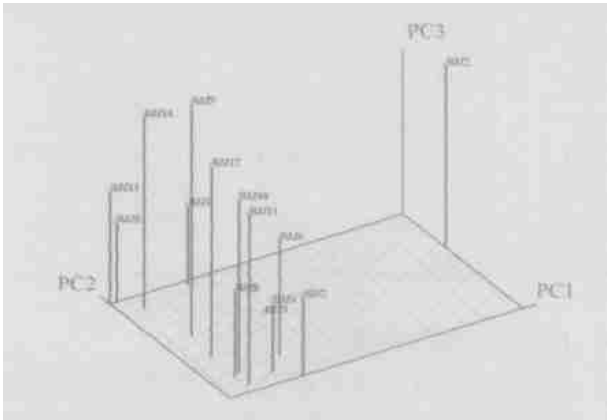


图 2 猪血木 14 个个体 Jaccard 相似性系数
经 UPGMA 法构建的树系图
Fig 2 UPGMA tree showing relationships among
14 individuals in *Eurydendron excelsum* established from
Jaccard similarity coefficients

图 3 基于 RAPD 表型特征的主成分分析（PCA）
Fig 3 Plot of principal components ananlysis
（PCA）based on RAPD phenotypic characters

图 3 是对 RAPD 谱带表型进行主成分分析（PCA）获得的 3 维分布图，显示了个体间相似性的格局，支持 UPGMA 聚类结果。提取的前 3 个主

3 讨论
采用分子标记技术研究山茶科植物种群遗传变异的报道还相对很少，并且这些工作也多集中在具重要经济价值的茶 *Camellia sinensis* 方面。例如，Singh 等应用 RAPD 标记分析印度喜马拉雅生物资源研究所茶种群发现，平均每个引物检测到 6.3 个

位点，所用 20 个引物中仅有 1 个引物能检测到 1 个多态位点，表现出极低水平的变异性^[19]。Kaudun 和 Park 对分布于韩国的 6 个茶种群进行 RAPD 分析显示，40 个能扩增出清晰谱带的引物中，只有 12 个引物能检测到共 25 个多态位点；他们仅对这 12 个能扩增出多态性产物的引物所获得的谱带数据作了进一步分析，发现多态位点比率介于 72% ~ 90%，Nei 基因多样性取值范围为 0 ~ 0.5^[20]。本研究对猪血木目前存于广东阳春八甲镇的 14 株个体的 RAPD 分析表明，它还保留有比较丰富的遗传多样性。

一般认为，濒危物种所经历的个体数目遽减会直接造成残留种群的遗传多样性丧失^[6]。根据中性理论的推断，中性座位的遗传多样性同有效种群大小呈正相关。种群大小受限时，遗传漂变将致使大多数基因座位上等位基因被固定的概率增加^[21]。因而小种群对遗传漂变的作用比大种群更为敏感，尤其是稀有等位基因在小种群中丢失得更快。*Limonium cavanillesii* 属极度特有植物（现存种群的所有 29 个个体生长在一个地点），Palacios 和 Gonzalez-Candelas 使用 11 个引物对该种群进行 RAPD 分析，结果观察到的带型全部一致，没有检测到遗传变异^[22]。台湾特有的珍稀蕨类植物伊藤原始观音莲座蕨 *Archangiopteris itoi* 在其原发现地的“模式”种群由于人为破坏已完全消失。所幸的是，在台湾北部的乌来又发现了该植物的另一残遗种群。Hsu 等通过研究这一新发现种群的所有 18 个个体的 RAPD 图谱，检测到低水平的变异性；所用 40 个引物中，只有 1 个引物能扩增出多态产物，共获得 6 种谱型^[23]。但是，需要强调的是，并非所有野生植物的种群大小和遗传多样性都具正相关。加州扇叶棕榈 *Washingtonia filifera* 就是例外^[24]。我们在猪血木中也检测到较高的遗传变异。这一方面可能是因为猪血木具有两性花，授粉率较高^[25]；另一方面可能是因为历史上猪血木分布于阳春八甲镇的种群具有丰富的遗传多样性。据载，阳春八甲的猪血木曾成片分布，直至 20 世纪 50 年代大跃进时才被大量砍伐^[25]。

发现猪血木仍保留有较为丰富的遗传多样性无疑对其现有种群的恢复和新种群的建立具有重要意义。根据本研究结果，我们提出应该尽快在阳春八甲镇建立保护区，对猪血木的 14 株个体全部进行原地保护，特别是对遗传关系相对孤立的 2 号个体应实施重点保护。同时还应积极改善当地生境，推进猪血木种质资源的收集和基因库的建立，加速开展繁殖生物学、生理生态学研究，深入了解其生物

学特性。在获得这些资料的基础上，再尝试将猪血木引入新的栖息地。

参考文献:

[1] 张宏达. 山茶科一新属, 猪血木属[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1963(4): 126—130.

[2] 张宏达. 山茶属植物的系统研究[M]. 广州: 中山大学出版社, 1981.

[3] 张宏达. 中国植物志第 49 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1998.

[4] 叶华谷, 王发国, 周联选, 等. 山茶科濒危树种猪血木[J]. 植物学杂志, 2002, 4: 3.

[5] 傅立国, 金鉴明. 中国植物红皮书—稀有濒危植物(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1992.

[6] FRANKHAM R, BAILLOU J D, BRISCOE D A. A primer of conservation genetics[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

[7] 应俊生, 张玉龙. 中国种子植物特有属[M]. 北京: 科学出版社, 1994.

[8] SCHEMSKE D W, HUSBAND B C, RUCKELSHAUS M H, et al. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants[J]. Ecology, 1994, 75: 584—606.

[9] ROSSETO M, WEAVER P K, DIXON K W. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae)[J]. Molecular Ecology, 1995, 4: 321—329.

[10] 王艇, 苏应娟, 李雪雁, 等. 子遗植物桫欏种群遗传变异的 RAPD 分析[J]. 生态学报, 2003, 23(6): 1200—1205.

[11] 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.

[12] BACHMANN K. Nuclear DNA markers in plant biosystematic research[J]. Opera Bot, 1997, 132: 137—148.

[13] BEEBEE T, ROWE G. An introduction to molecular ecology[M]. Oxford: Oxford University Press, 2004.

[14] STEWARD C N JR, EXCOFFIER L. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry)[J]. J Evol Biol, 1996, 9: 153—171.

[15] 傅立国. 中国珍稀濒危植物[M]. 上海: 上海教育出版社, 1989.

[16] SU Y J, WANG T, YANG W D, et al. DNA extraction and RAPD analysis of *Podocarpus*[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(4): 13—18.

[17] YEH F C, YANG R. POPGENE version 1.31. Department of Renewable Resources, University of Alberta <http://www.ualberta.ca/~fyeh>, 1999.

[18] ROHLF F J. NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8[M]. Exeter Software, NY, 1993.

[19] SINGH M, SAROOP J, DHIMAN B. Detection of intra-clonal genetic variability in vegetatively propagated tea using RAPD markers[J] . *Biologia Plantarum*, 2004, 48: 113—115.

[20] KAUNDUN S S, PARK Y G. Genetic structure of six Korean tea populations as revealed by RAPD-PCR markers [J] . *Crop Science*, 2002, 42: 594—601.

[21] HARTL D L, CLARK A G. Principles of population genetics [M] . Sunderland: Sinauer, 1997.

[22] PALACIOS C, GONZALEZ-CANDELAS F. Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers [J] . *Molecular Ecology*, 1997, 6: 671—675.

[23] HSU T W, MOORE S J, CHIANG T Y. Low RAPD polymorphism in *Archangiopteris itoi*, a rare and endemic fern in Taiwan[J] . *Bot Bull Acad Sin*, 2000, 41: 15—18.

[24] McCLENAGHAN L R, BEAUCHAMP A C. Low genetic differentiation among isolated populations of the California fan palm (*Washingtonia filifera*) [J] . *Evolution*, 1986, 40: 315—322.

[25] 王跃华, 闵天禄, 胡晓立, 等. 山茶科濒危植物猪血木的生态与繁殖特性[J] . *云南植物研究*, 2002, 24(6): 725—732.

Genetic Differentiation and Conservation of 14 Surviving Individuals of *Euryodendron excelsum* Endemic to China

WANG Ting¹, SU Yingjuan¹, YE Hua gu², OUYANG Pu yue¹, JIANG Yu¹,
SUN Yu fei¹, CHEN Guo pei¹, DENG Feng¹, ZHANG Hong da¹

(1.School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2.South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: RAPD markers were used to assess the genetic variations and the evolutionary relationships among all 14 individuals of a critically endangered *Euryodendron excelsum* (Theaceae) population remaining at Ba Jia Zhen, Yangchun, Guang dong, China. Twenty three random primers detected 156 sites, out of which 95 (60.26%) were polymorphic loci. Number of observed alleles was 1.6090, number of effective alleles was 1.3471, Nei’s gene diversity was 0.1993, and Shannon index was 0.1534. Relatively high level of genetic variation was identified in *E. excelsum*. UPGMA tree established from Jaccard similarity coefficients exhibited that 14 individuals were clustered into two subgroups, showing that the number 2 plant was genetically distant from the rest of plants. The UPGMA clustering was also lent support by a principle components analysis (PCA) of RAPD phenotypic data. Management and conservation strategy of *E. excelsum* was proposed based on our results.

Key words: *Euryodendron excelsum*; population genetic variation; RAPD markers; conservation management