

深圳塘朗山杪椏子遗种群的遗传分化研究^{*}

苏应娟, 王 艇, 李雪雁, 陈国培, 江 宇, 欧阳蒲月, 郑 博
(中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 应用 RAPD 标记分析了深圳塘朗山杪椏子遗种群全部 57 个个体的遗传变异和进化关系。50 个引物共检测到 171 个位点, 其中多态位点 10 个, 多态位点比率 5.85%。基于基因频率的 Shannon 多样性指数平均值为 0.0165, Nei 基因多样性指数平均值为 0.0094, 表明该种群的遗传多样性水平极低。对 Jaccard 相似性系数矩阵用 UPGMA 法进行聚类分析显示, 57 个个体可分为 4 个亚群。RAPD 谱带表型的主成分分析 (PCA) 支持聚类分析结果。根据研究结果讨论了种群的管理和保护策略。

关键词: 杪椏; 种群; RAPD 标记; 遗传变异

中图分类号: Q941; Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 06-0069-04

杪椏 *Alsophila spinulosa* (Hook.) Tryon 俗名树蕨, 是著名的子遗植物。在距今约 1.8 亿年前的中生代侏罗纪曾经十分繁盛, 但由于第四纪冰川的侵袭, 种群遭到极大破坏, 分布范围急剧缩小^[1]。现在杪椏主要分布在热带亚热带静风、高湿和荫蔽的山地林中, 幸存的种群和个体数量十分有限, 已被列为国家一级保护植物。近些年由于经济利益的驱动, 杪椏所受到的威胁日深, 不少种群濒于灭绝, 如何拯救这一具重要科研价值的古老子遗植物已成为许多人关心的课题。

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术经常被用于分析种群的遗传变异。该技术对珍稀濒危物种的研究具有一些潜在优势, 它方法简捷、所费相对便宜而且可以检测到大量的多态位点, 这对分析遗传变异水平较低的物种很有意义。然而, RAPD 也有带型可重复性欠佳的不足。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分析方面的困难也被 Stewart 和 Excoffier 提出的方法较好地解决^[2]。

在深圳西部的塘朗山发现有天然的杪椏子遗种群, 个体数目仅残存 57 个。该种群同分布于广东境内的其他杪椏种群在地理位置上偏于孤立, 其生境正被不断侵蚀, 研究种群的遗传变异, 以期为保护管理奠定基础已显得十分迫切。本文运用 RAPD 标记以这一种群的所有个体为材料对它们的遗传分化进行了分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

在深圳西部的塘朗山, 杪椏仅见于沟谷南坡, 沿小溪生长, 范围 100 m 内, 共 57 个个体。植株高度为 0.20~2.10 m, 胸围 10~56 cm。本研究采摘该种群所有 57 个个体的新鲜叶片。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^[3]。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 167 个 10 碱基随机寡核苷酸引物中筛选出 50 个扩增产物稳定、重复性好的引物进行 RAPD 扩增。引物序列见表 1。

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 buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris HCl, pH=1.0% Triton X-100, 20 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL, 引物 (1.5 μmol/L) 0.3 μL, dNTP (0.2 mmol/L) 0.5 μL, 模板 1 μL (70 ng), Taq 酶 0.5 μL (0.5U), 反应混合物用 20 μL 石蜡油覆盖。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

* 收稿日期: 2002-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170101); 国家自然科学基金重点资助项目 (39830310); 广东省自然科学基金资助项目 (011125)

作者简介: 苏应娟 (1965 年生), 女, 副教授; E-mail: ls97@zsu.edu.cn

Elmer Corporation) 上进行。扩增产物经 $w = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下观察、照相。

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

引物	序列(5'→3')	引物	序列(5'→3')
S2	TGATCCCTGC	S382	TGGGCGTCAA
S5	TGCGCCCTTC	S404	GCGCGTTGTC
S17	AGGGAACGAG	S405	GCGAAGTGTT
S57	TTTCCCAAGG	S423	GGTACTCCCC
S71	AAAGCTGCGG	S428	ACCTCAGCTC
S73	AAGCCTCGTC	S451	GACAGGAGGT
S77	TTCCCCCAG	S456	TCGGCGGTTC
S85	CTGAGACGGA	S463	CTGATAAGCC
S90	AGGGCCGTCT	S487	CCCAGATGGT
S91	TGCCCGTGGT	S492	AGTAGGGCAC
S103	AGACGTCCAC	S504	CCCGTAGCAC
S106	ACGCATCGCA	S507	ACTGGCCTGA
S120	GGGAGACATC	S511	GTAGCCGTCT
S121	ACGATCCTTG	S1017	CAGTGGGGAG
S134	TGCTGCAGGT	S1178	GTCGTCGACA
S145	TCAGGAGGT	S1192	CAGCTCCTGT
S152	TTATCGCCCC	S1273	CCAAGCACAC
S182	CCTCTGACTG	S1299	CTCGATCACC
S194	AAAGGGGTCC	S1340	ACACTCGGCA
S236	ACACCCACACA	S1349	CCGATCCAAC
S312	TCGCCAGCCA	S1360	TCATTCGCCC
S314	ACAGGTGCTG	S2012	GTTGGGCAC
S320	CCCAGCTAGA	S2018	CTCGGATGTC
S359	GGACACCACT	S2061	TCACTCGCTC
S378	CCTAGTCGAG	S2101	GGAGCTGACT

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。

将每个 RAPD 扩增条带视为具有两个等位基因 (1 和 0) 的复等位基因位点, 求算基因频率矩阵, 利用 PopGen32 软件计算基于基因频率的 Shannon 多样性、观测等位基因数、有效等位基因数、基因多样性指数。

应用 NTSYSp2 软件, 选择 UPGMA 法对 Jaccard 相似性系数进行聚类分析; 对 RAPD 表型数据矩阵进行主成分分析 (PCA)。

2 结 果

用 50 个随机引物对深圳塘朗山桫欏种群 57 个个体的基因组 DNA 进行的 RAPD 分析显示, 每个引物测到的位点数在 1~7 个之间, 扩增片段长度介于 300~3 000 bp。50 个引物共检测到 171 个位点, 平均每个引物检测到的位点数为 3.42。50 个

引物中, 有 5 个引物 S314、S405、S456、S463 和 S2061 分别检测到 1、2、1、4 和 2 个多态性位点, 多态位点比率 5.85%。

基于基因频率的 Shannon 多样性指数结果显示, 各引物扩增结果估算出的值在 0~0.276 5 之间变动, 平均值为 0.016 5。Nei 基因多样性估测结果见表 2, 基因多样性指数平均为 0.009 4。

对 Jaccard 相似性系数用 UPGMA 法进行聚类分析的结果表明, 桫欏塘朗山种群的 57 个个体可分为 4 个分支 (图 2); sz18、sz44 与 sz45 各构成一个亚群, sz37、sz02、sz09、sz14、sz25、sz41、sz55 和 sz57 共 8 个个体构成一亚群, 其余的 46 个个体组成一个亚群。亚群之间有 97.41%~99.20% 的相似性; 而亚群内个体间的相似性为 99.33%~99.90%。图 3 是依据提取的前 3 个主成分获得的 3-D 分布图, 显示了个体间相似性的格局。基于 RAPD 谱带表型的主成分分析 (PCA) 支持 UPGMA 聚类结果。

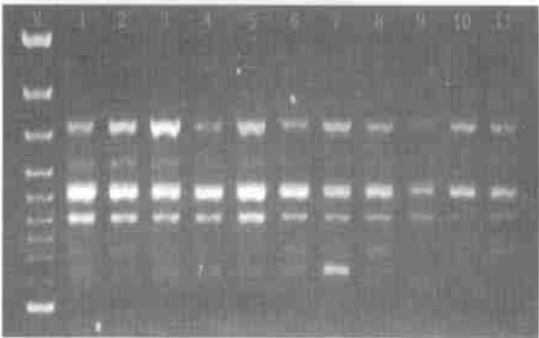


图 1 用引物 S1340 对桫欏个体 (1—11) 扩增出的 RAPD 带型, M (100 bp ladder marker)
Fig 1 RAPD pattern amplified from individuals (1—11) of *Alsophila spinulosa* by the primer S1340

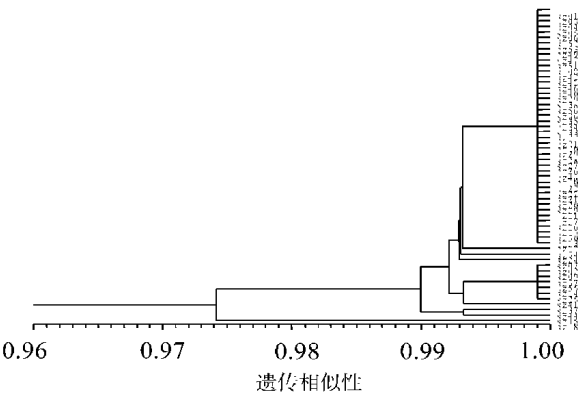


图 2 桫欏种群 57 个个体 Jaccard 相似性系数矩阵经 UPGMA 法构建的树系图
Fig 2 Dendrogram generated from Jaccard similarity coefficient matrix of 57 individuals in *Alsophila spinulosa* population by using UPGMA method

表 2 杪栲种群的基因多样性

Tab 2 Gene diversity of *Alsophila spinulosa* population

引物	平均观察 等位基因数	平均有效 等位基因数	基因多样 度指数	引物	平均观察 等位基因数	平均有效 等位基因数	基因多样 度指数
S2	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S382	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S5	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S404	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S17	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S405	1. 2857	1. 0280	0. 0241
S57	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S423	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S71	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S428	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S73	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S451	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S77	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S456	1. 5000	1. 1492	0. 1149
S85	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S463	1. 6667	1. 1989	0. 1532
S90	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S487	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S91	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S492	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S103	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S504	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S106	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S507	1. 0000	. 0000	0. 0000
S120	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S511	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S121	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S1017	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S134	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S1178	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S145	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S1192	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S152	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S1273	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S182	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S1299	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S194	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S1340	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S236	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S1349	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S312	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S1360	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S314	1. 3333	1. 0059	0. 0058	S2012	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S320	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S2018	1. 0000	1. 0000	0. 0000
S359	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S2061	1. 3333	1. 0557	0. 0441
S378	1. 0000	1. 0000	0. 0000	S2101	1. 0000	1. 0000	0. 0000
				Ave	1. 0585	1. 0119	0. 0094

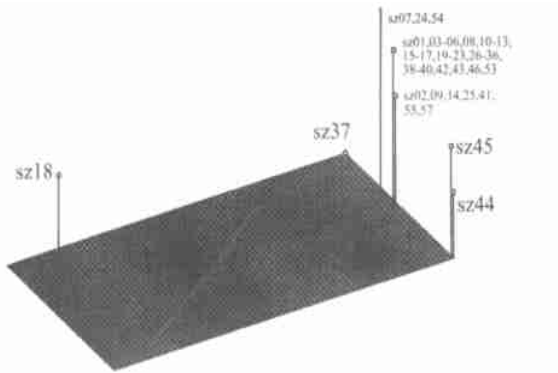


图3 基于 RAPD 表型特征的主成分分析 (PCA)
Fig 3 Principal components analysis (PCA)
based on RAPD phenetic characters

3 讨 论

利用酶电泳研究陆生和附生蕨类植物天然种群的遗传多样性已有一些报道。但是, 将基于 PCR 技术的分子标记用于蕨类种群的工作却还极为有限。

Schneller 等对远地鳞毛蕨 *Dryopteris remota* 种群的 RAPD 研究发现, 分子手段可以检测到更多的遗传变异位点, 从而提供等位酶无法揭示的种群遗传学信息^[4]。在本研究中, 我们运用 RAPD 技术定量分析了深圳塘朗山杪栲子遗种群全部 57 个个体的遗传变异和进化关系。该种群基于基因频率的 Shannon 指数平均为 0. 016 5, Nei 基因多样性指数平均为 0. 009 4, 大约只有其他蕨类植物种群相应值的 7%~10%和 7%~12%^[5, 6]; 反映出此子遗种群的遗传多样性水平极低。杪栲种群在遭受第四纪冰川的严重侵袭后, “瓶颈效应”(bottleneck effect) 和“建群者效应”(founder effect) 可能是导致其遗传变异水平低下的主要原因。被片段化的种群由于遗传漂变和缺乏有效基因流致使种群内的遗传分化程度降低, 这种现象在子遗植物中并不罕见。应用 RAPD 分析鳞茎虎耳草 *Saxifraga cernua* 的子遗种群, 无论是种群内还是同地区的种群间都检测不到遗传变异的存在^[7]。对子遗植物美加红松 *Pinus resinosa* 的研究也没有发现遗传变异^[8]。至于杪栲子遗种群极低的遗

传多样性是否和其繁育系统有关,则还有待于进一步的研究。

作为起源古老的孑遗植物,桫欏保留的一些独特生物学性质使它不能很好地适应现代气候条件和环境,只能在极其有限的适宜生境中残存。例如,它的孢子寿命短(仅有 7~8 d),而且萌发条件也极为苛刻;从孢子萌发到幼孢子体形成生活周期长达一年以上,其间丝状体和原叶体缺乏保护性结构,极易被恶劣环境因子伤害;孢子萌发、配子体和胚胎的形成对生境要求非常严格;此外,它无发达根系,输导系统也较原始^[9,10]。种群遗传分化的研究能为深圳塘朗山野生桫欏的管理和保护提供重要的理论依据。根据 57 个个体进化关系的聚类分析结果和主成分分析提供的遗传相似性分布格局,我们认为在资源和经费有限时,应首先对 sz07、sz18、sz24、sz37、sz44、sz45 和 sz54 等 7 个个体进行重点拯救,在此基础上也对其余的 50 个个体予以保护。

参考文献:

- [1] TRYON R M. The classification of Cyatheaceae[J]. Contr Gray Herb, 1970, 200: 3—53.
- [2] 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.
- [3] SU Y J, WANG T, YANG W D, et al. DNA extraction and

RAPD analysis of *Podocarpus*[J]. Acta Sci Natur Univ Sunyatseni, 1998, 37(4): 13—18.

- [4] SCHNELIER J, HOLDEREGGER R, GUGERLI F, et al. Patterns of genetic variation detected by RAPDs suggest a single origin with subsequent mutations and long-distance dispersal in the apomictic fern *Dryopteris renata* (Dryopteridaceae)[J]. Amer Jour Bot, 1998, 85: 1038—1042.
- [5] KEIPER F J, McCONCHIE R. An analysis of genetic variation in natural populations of *Sticherus flabellatus*[R Br (St John)] using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers[J]. Mol Ecol, 2000, 9: 571—581.
- [6] CAMACHO F J, LISTON A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR)[J]. Amer J Bot, 2001, 88: 1065—1070.
- [7] BAUERT M R, KALIN M, BALTISBERGER M, et al. No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers[J]. Mol Ecol, 1998, 7: 1519—1527.
- [8] MOSSELER A J, EGGER K N, INNES D J. Life history and the loss of genetic diversity in red pine[J]. Amer Jour Bot, 1993, 80: 240.
- [9] TRYON A F, LUGARDON B. Spores of the Pteridophyta[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1990.
- [10] 夏群. 中国桫欏科植物的分类[J]. 植物分类学报, 1989, 27(1): 1—16.

Studies on the Genetic Differentiation of a Relict Population of *Alsophila spinulosa* in Tanglangshan Mountain, Shenzhen, China

SU Ying juan, WANG Ting, LI Xue yan, CHEN Guo pei, JIANG Yu,
OUYANG Pu yue, ZHENG Bo

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: RAPD markers were used to assess the genetic variations and the evolutionary relationships of all 57 individuals of a relict population of *Alsophila spinulosa* naturally grown in Tanglangshan mountain, Shenzhen, South China. 50 random primers detected 171 sites of which 10 ones were polymorphic, the percentage of polymorphic sites was 5.85%. Average values of index of Shannon diversity based on gene frequencies and Nei's index of gene diversity were 0.016 5 and 0.009 4, respectively, which demonstrated that the relict population possesses very low level of genetic diversity. Cluster analysis of the Jaccard coefficient matrix using UPGMA method revealed that 57 individuals were clustered into 4 subpopulations which was also lent support from the spatial representation of principle components analysis (PCA) of RAPD phenetic patterns. Management and protection strategy of the relict population was discussed based on these results.

Key words: *Alsophila spinulosa*; population; RAPD markers; genetic variation