

栌菊木遗传多样性研究*

栾珊珊¹, 范眸天², 龚 洵^{1**}

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 利用分子标记 ISSR 方法, 从 100 个随机引物中选取了 11 个对栌菊木 13 个自然居群 (220 个个体) 和一个迁地保护居群 (17 个个体) 的遗传多样性进行了研究, 结果表明, 栌菊木的遗传多样性水平并不低, 其濒危状况可能主要是由生态因素引起的, 该研究为对栌菊木制定有效的保护措施提供了科学依据。

关键词: 栌菊木; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: Q 949.783.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 390X(2006)06 - 0703 - 04

Genetic Diversity of *Nouelia insignis*

LUAN Shan-shan¹, FAN Mou-tian², GONG Xun¹

(1. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2 Faculty of Horticulture and Landscape, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: In this study, genetic diversity of *Nouelia insignis* was detected using ISSR. 13 primers was selected from 100 random ISSR primers. Based on the results of this experiment, it was ecological factors but not low genetic diversity that led to the endangered status of this species. The results of this study supplied valuable information for the conservation of *Nouelia insignis*.

Key words: *Nouelia insignis*; genetic diversity; ISSR

栌菊木 (*Nouelia insignis* Franch) 是菊科 (Asteraceae) 管状花亚科帚菊族 (Mutisieae) 的单型属, 为国家二级保护植物, 它是中国特有的珍稀濒危植物和我国稀有的菊科木本植物, 分布于北纬 24°~30° 和东经 99°40'~103°50' 的滇黔地区。栌菊木是我国滇北和川西海拔 1 000~2 800 m 干旱谷地的特有种^[1], 多生长于干热地区的裸露山地, 耐贫瘠且生长速度快, 根系发达, 在向阳、湿润的岩石缝和悬崖峭壁处生长较好^[2], 在干热河谷植物区系研究以及植物对特殊环境的适应性等研究方面有极其重要价值。对栌菊木的遗传多样性研究仅见于彭玉兰^[3]对其云南地区 10 居群进行等位酶研究。等位酶技术因为只能检测到编码蛋白的基因而导致对遗传多样性水平的低估, 而且其取样未能覆盖栌菊木现有的分布范围, 特别是缺乏其分布区

边缘的居群, 具有一定程度的不合理性。

近几十年来, 由于生境片段化和人为的直接破坏, 栌菊木的个体数量急剧减少, 濒危状况日益严重。根据野外实地考察, 目前栌菊木的大多数居群个体数量都不超过 50, 而所有现在居群个体总量也不过 5 000, 鉴于栌菊木受到严重威胁的现状及其作为特有的单型属植物而具有的独特性, 对其实行切实有效的保护已经刻不容缓。

本文利用分子标记 ISSR 方法选取了 13 个具有代表性的居群进行了遗传多样性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所选用的 13 个居群中 10 个来自云南, 其余 3 个取自四川 (攀枝花、米易、德昌), 具体位

收稿日期: 2006 - 03 - 01

* 基金项目: 云南省自然科学基金 (2003C0062M)。

** 通讯作者

作者简介: 栾珊珊 (1980 -) 女, 山东青岛人, 在读硕士研究生, 主要从事保护遗传学研究工作。

置及每个居群的取样数见表 1。这 13 个居群在地理位置上明显地分为两个区域,即金沙江流域和南盘江流域(包括华宁、弥勒、江川 3 个居群)。从所采用的 220 个个体植株上分别选取 2~3 个新鲜叶片,用硅胶干燥后保存于 4 直至提取 DNA。另有昆明植物园迁地保护居群一个,处理方法同上。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

将干燥叶片在液氮中研磨成粉末后,利用 CTAB 法^[4]提取总 DNA。PCR 扩增条件:(1) 20 μL 反应体系中包括, 20 ng 模板 DNA, 2.0 μL 10 \times PCR buffer, 2.2 mmol/L MgCl_2 , 0.12 mmol/L dNTPs, 3% 甲酰胺, 400 nmol 的 ISSR 引物(来自哥伦比亚大学设计的 100 个引物), 0.5 单位的 Taq 酶(Takara),其余部分为双蒸水。(2) PCR 扩增程序为:首先 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 然后按如下条件进行 38 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。(3)电泳条件:取 PCR 产物 8 μL 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上点样,在 1 \times TBE 缓冲液及 4 V/cm 电压条件下电泳后于 0.5% EB 中浸泡 30 min,照像。

1.3 数据分析

居群遗传变异以利用 Popgene v. 1.31^[5]软件得出的以下参数来衡量,即 PPB(多态位点百分数),A(等位基因平均数), A_e (有效等位基因数)及 H_e (期望杂合度)等。居群间的遗传分化采用 Nei 基因分化系数 G_{st} 来度量。

2 结果

从哥伦比亚大学提供的 100 个 ISSR 引物中筛选出 11 个(表 2)能产生清晰、可重复性条带者,扩增得 103 条带。用 popgene 软件分析结果为在物种水平上栎菊木的多态位点为 65.05%,总的种群遗传变异度 $H_t=0.1984$ (0.0395),种群内的平均杂合度 $H_s=0.147$ (0.0235)遗传多样性水平不是很低,即遗传多样性水平不是造成其濒危的原因。遗传分化系数 G_{st} 为 0.2571 基因流 N_m 值为 0.7222。用 AMOVA 分析得 st 值为 0.223,与 Popgene 分析结果的 G_{st} 值非常接近。

对金沙江和南盘江两个流域分别进行分析得:金沙江流域遗传多样性明显高于南盘江流域。两个流域的多态位点百分数分别为 62.14% 和

46.60%,有效等位基因数 N_e 分别为 1.3937(0.3828)和 1.3228(0.3897),但两个流域之间的遗传分化系数 G_{st} 值仅为 0.0712,且基因流值较大(3.3130)。

3 讨论

3.1 遗传多样性和遗传分化

HAMR IK^[6],肖龙骞^[7]等总结了 662 种植物的遗传多样性和遗传分化所得平均值为: $PPB=71.1\%$, $A=2.38$, $H_e=0.169$, $G_{st}=0.228$ 。本研究所得的以上参数分别为 $PPB=65.05\%$, $A=1.65$, $H_e=0.2248$, $G_{st}=0.2571$,二者差别不是很大。这表明,栎菊木的濒危并不因其过低的遗传多样性造成的,生境的破碎和片段化以及人为的直接干扰可能才是导致其濒危的直接原因。

金沙江和南盘江两个流域之间的遗传分化系数 G_{st} 为 0.0712,基因流值 N_m 为 3.3130。鉴于两个流域较远的地理距离及山脉河流等形成的天然屏障,二者的居群之间在现代要发生大的基因流是不太可能的。WRIGHT^[8]认为群体间的基因流值若小于 1,有限的基因流是促使群体发生遗传分化的主要原因。如果选择压力(生态气候、生长环境等)很大,即使 N_m 值大于 1 也不能代表群体间发生了基因流。 N_m 值大于 1 可能代表过去的基因流而不能反映现在的实际基因交换情况^[9]。由此,金沙江和南盘江两个流域的遗传分化不明显很可能是由于栎菊木在冰期过后由一个其避难所向另一个流域扩散时,建立者个体数目足够多,携带了足够多的遗传异质性,而扩散后隔离时间又不够长,以至于两个流域间没有产生明显的遗传分化。

3.2 对制定保护策略的建议

栎菊木目前十多个自然居群的个体数大都少于 50。FRANKEL^[10]等指出,有效居群个体达到 500 个时才能中以维持居群内数量性状的遗传变异和居群对未来环境变化的适应能力。对植物园迁地保护居群用同样方法检测得其多态性带有 38 条,多态位点百分数为 36.89%,未能覆盖足够多的遗传多样性,且个体数太少,不能满足有效种群大小。另外,该迁地保护居群的生活力用生长势明显降低,不能满足保护该物种长期生存和演化的要求。

因此,考虑到对栎菊木的保护策略,应当优先

采取就地保护的办来保存现存的居群,根据本研
究所得出的结果,金沙江流域总体的遗传多样性比
南盘江流域高,如多态位点百分数前者为 62.14%,
后者仅 46.60%,前者的有效等位基因数 N_e 为
1.3937(0.3828)而后者为 1.3228(0.3897)。并
且二者遗传多样性的差异仅表现多态带的频率,而
不是特征带的有无,因此,金沙江流域的居群可以
完全覆盖南盘江流域各居群的遗传多样性。

实行就地保护,首先要解除该物种所面临的
确定性威胁,如生境片段化和人为直接破坏等。选
取合适的地点对加强对特定居群的保护,尤其是个
体数较多且更新能力较强的居群,例如现存的永胜
居群,是目前仅有的一个个体数量超过 1 000 的
居群,且有大量幼苗,是实行就地保护最理想的居
群。

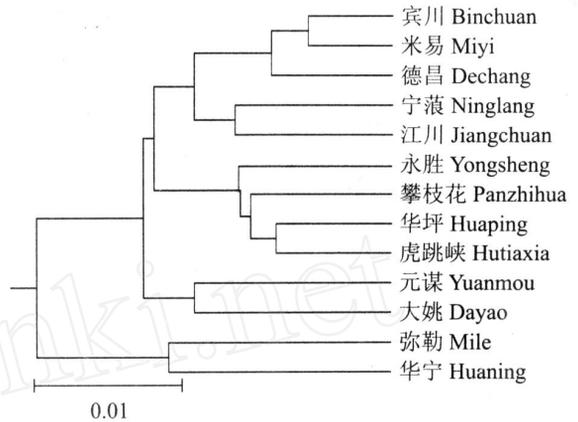


图 3 栎菊木各居群聚类图

Fig. 3 Endrogram of population of *Nouelia insingis*

表 1 栎菊木各居群来源

Tab 1 Populations of *Nouelia insingis* examined in the ISSR analysis

code	population	sample size	latitude (N)	longitude (E)
LS	Liangshan	17	25 46	101 50
DY	Dayao	17	25 51	101 06
PZH	Panzihua	17	26 24	101 46
HP	Huaping	17	26 35	101 21
YS	Yongsheng	17	26 34	100 48
HTX	Hutiaoxia	17	27 19	100 08
NL	Ninglang	17	27 21	100 51
BC	Bingchuan	17	25 50	100 36
MY	Miyi	17	26 54	102 13
DC	Dechang	17	27 38	102 17
JC	Jiangchuan	16	24 21	102 43
ML	Mile	17	24 41	103 40
HN	Huaning	17	24 17	102 51

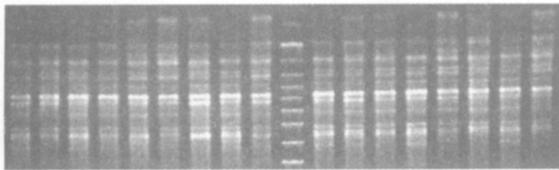


图 1 引物 UBC # 807 对宁蒍居群扩增出的产物条带
Fig. 1 Electrophoresis of PCR product of Population Ninglang via UBC # 807

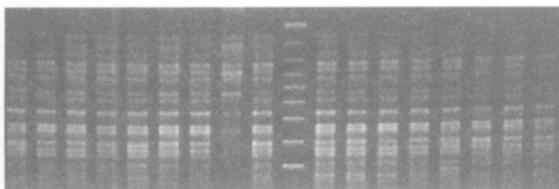


图 2 引物 UBC # 827 对宾川样品扩增出的产物条带
Fig. 2 Electrophoresis of PCR product of Population Bingchuan via UBC#827

表 2 引物及其序列

Tab 2 List of ISSR primers and their sequences used in this study

primer code	nucleotide sequence 5' to 3'	No. of analyzed bands	No. of polymorphic bands
807	A G A G A G A G A G A G T	11	7
811	G A G A G A G A G A G A G A C	9	7
822	T C T C T C T C T C T C T C A	6	3
827	A C A C A C A C A C A C A C G	13	10
840	G A G A G A G A G A G A G A G A (CT) T	11	8
855	A C A C A C A C A C A C A C (CT) T	9	7
856	A C A C A C A C A C A C A C (CT) A	10	6
857	A C A C A C A C A C A C A C (CT) G	9	6
881	G G G T G G G G T G G G A G A	10	8
889	(AGT) (CGT) (AGT) A C A C A C A C A C A C	7	3
890	(ACG) (ACT) (ACG) G T G T G T G T G T G T	8	2
total		103	67

表 3 栎菊木遗传一致性与遗传距离分析

Tab 3 Nei's^[10] pairwise genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between *Noouelia insignis* populations

pop	D	YM	DY	PZH	HP	YS	HTX	NL	BC	MY	DC	JC	ML	HN
YM	* * * *	0.952 4	0.945 8	0.943 7	0.935 6	0.924 6	0.935 7	0.936 7	0.951 4	0.930 3	0.932 7	0.924 5	0.912 5	
DY	0.048 8	* * * *	0.954 0	0.945 8	0.936 3	0.940 2	0.951 9	0.952 4	0.955 4	0.941 8	0.941 5	0.944 3	0.923 3	
PZH	0.055 7	0.047 1	* * * *	0.970 3	0.960 8	0.959 2	0.948 7	0.946 7	0.958 6	0.948 2	0.946 7	0.920 0	0.911 8	
HP	0.057 9	0.055 8	0.030 2	* * * *	0.962 4	0.968 4	0.945 9	0.943 0	0.946 9	0.935 2	0.947 4	0.919 7	0.896 2	
YS	0.066 6	0.065 8	0.040 0	0.038 3	* * * *	0.961 1	0.957 6	0.935 8	0.944 7	0.936 1	0.944	0.901 3	0.900 7	
HTX	0.078 4	0.061 6	0.041 7	0.032 1	0.039 7	* * * *	0.944 4	0.945 7	0.936 3	0.942 0	0.928 7	0.899 5	0.891 8	
NL	0.066 5	0.049 3	0.052 7	0.055 7	0.043 3	0.057 2	* * * *	0.947 9	0.956 3	0.962 7	0.960 3	0.939 7	0.942 8	
BC	0.065 4	0.048 8	0.054 8	0.058 6	0.066 4	0.055 8	0.053 5	* * * *	0.974 6	0.959 8	0.944 9	0.922 5	0.930 1	
MY	0.049 8	0.045 6	0.042 3	0.054 6	0.056 9	0.065 9	0.044 7	0.025 7	* * * *	0.974 0	0.961 2	0.929 1	0.933 6	
DC	0.072 3	0.060 0	0.053 2	0.067 0	0.066 1	0.059 7	0.038 0	0.041 0	0.026 4	* * * *	0.939 8	0.911 0	0.922 7	
JC	0.069 7	0.060 3	0.054 8	0.054 1	0.057 3	0.073 9	0.040 6	0.056 6	0.039 5	0.062 1	* * * *	0.958 7	0.953 1	
ML	0.078 5	0.057 3	0.083 4	0.083 7	0.103 9	0.105 9	0.062 2	0.080 7	0.073 6	0.093 2	0.042 2	* * * *	0.948 3	
HN	0.091 6	0.079 8	0.092 4	0.109 6	0.104 5	0.114 5	0.058 9	0.072 4	0.068 7	0.080 4	0.048 0	0.053 1	* * * *	

表 4 栎菊木各个居群的 ISSR 分析结果

Tab 4 Genetic variability within populations of *Noouelia insignis* revealed by ISSR analysis

population	P	He	Ho
LS	41.75	0.182 0(0.219 5)	0.261 4(0.313 0)
DY	32.04	0.126 5(0.197 5)	0.184 2(0.282 4)
PZH	39.81	0.165 9(0.212 4)	0.240 2(0.303 6)
HP	41.75	0.177 1(0.217 4)	0.255 4(0.309 6)
YS	34.95	0.141 9(0.204 5)	0.206 2(0.292 0)
HTX	39.81	0.165 8(0.220 0)	0.237 7(0.310 2)
NL	31.07	0.135 2(0.206 5)	0.194 0(0.293 8)
BC	34.95	0.148 8(0.208 3)	0.214 8(0.298 0)
MY	33.01	0.140 5(0.205 0)	0.202 9(0.293 7)
DC	32.04	0.131 1(0.201 5)	0.189 9(0.285 7)
JC	37.86	0.165 0(0.217 4)	0.236 7(0.308 9)
ML	34.95	0.132 8(0.194 8)	0.195 7(0.280 8)
HN	33.01	0.126 0(0.191 2)	0.185 7(0.276 7)
mean (s.d.)	35.92 (8.74)	0.149 1(0.056 0)	0.215 8(0.185 7)

N = the sample size; P = the percentage of polymorphic loci;

He = the expected heterozygosity; Ho = the Shannon's diversity index

[参考文献]

[1] 王荷生. 中国种子植物特有属起源的探讨 [J]. 云南植物研究, 1989, 11(1): 1 - 16

- [2] 蒋兴鹿. 栎菊木 *Noouelia insignis* Franch 中国珍稀濒危植物 [M]. 上海: 上海教育出版社, 108
- [3] 彭玉兰, 胡运乾. 栎菊木的等位酶分析及其在生物地理和保护生物学上的意义 [J]. 云南植物研究, 2003, 25 (5): 563 - 571.
- [4] DOYLE J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[A]. In: Hewitt GM, Johnston A, eds Molecular Techniques in Taxonomy [C]. Berlin: Springer, 1991: 283 - 293.
- [5] YEH F C, YANG R C, BOYLE T. POPGENE Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis[Z]. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [6] HAMRICK J L, GODT M J W, SLEIGH H B. Factors Influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. New Forest, 1992, 6: 95 - 124.
- [7] 肖龙骞, 葛学军. 贵州苏铁的遗传多样性研究 [J]. 云南植物研究, 2003, 25(6): 648 - 652
- [8] WRIGHT S. Evolution in Mendelian population [J]. Genetics, 1931, 16: 97 - 159.
- [9] FANKEL OH, BROWN AHD, BURDEN JJ. The conservation of plant biodiversity [M]. Cambridge MA: Cambridge University Press, 1995.
- [10] NEI M. Molecular Population genetics and Evolution [M]. New York: Elsevier, 1975.