

贵州苏铁遗传多样性研究*

肖龙骞^{1,2}, 葛学军³, 龚 洵^{2**}, 郑思乡¹

(1 云南农业大学, 云南 昆明 650201; 2 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204;

3 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

Genetic Diversity of *Cycas guizhouensis* *XIAO Long-Qian^{1,2}, GE Xue-Jun³, GONG Xun^{2**}, ZHENG Si-Xiang¹

(1 Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China;

2 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

3 South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Key words: *Cycas guizhouensis*; ISSR; Genetic diversity; Genetic differentiation; Conservation**关键词:** 贵州苏铁; ISSR; 遗传多样性; 遗传分化; 保护**中图分类号:** Q 943 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253 - 2700(2003)06 - 0648 - 05

贵州苏铁 (*Cycas guizhouensis*) 是我国一级保护植物。尽管其分布区仅限于滇、桂、黔三省交界的南盘江流域, 却是中国苏铁属植物中分布最广的一个种。同时, 它也是我国少数几种分布在北回归线以北的苏铁植物之一, 对古植物和古气候等有着极为重要的研究价值 (杨成华等, 1996)。贵州苏铁像其它苏铁植物一样已经经历了两亿多年的沧桑巨变, 但近几十年以来, 由于生境片段化和人为的直接破坏, 其居群和个体数目急剧减少, 濒危状态日益严重。贵州苏铁的形态、分布、生态和繁殖等方面的研究已有报道 (杨成华等, 1996; 邓朝义, 1999), 但有关其遗传多样性的研究仅仅见于 Yang & Meerow (1999) 对它的 3 个居群进行过等位酶的研究。等位酶电泳技术因为只能检测到编码酶蛋白的基因位点而可能会低估遗传多样性水平 (葛颂和洪德元, 1994), 况且, 3 个居群的取样也缺乏代表性。遗传多样性是物种长期进化的产物, 也是其生存和发展的前提。稀有和濒危植物遗传多样性和群体遗传结构的研究, 是揭示其进化历史和适应潜力的基础, 也是进一步探讨其稀有和濒危机制的有效途径, 并将会为科学地制定保护策略和措施提供重要的依据 (葛颂等, 1994)。本文采用分子标记 ISSR 的方法对其现有的 12 个自然居群进行了遗传多样性研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

12 个自然居群的 215 个个体的新鲜叶子分别采自云南、贵州和广西三省, 具体位置和各个居群的个体数列于表 1 中。每个个体采取 3 ~ 5 个羽片, 用硅胶干燥, 再保存到 4℃ 处直至提取 DNA。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070081)

** 通讯作者 E-mail: gongxun@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2003 - 04 - 07, 2003 - 06 - 13 接受发表

作者简介: 肖龙骞 (1974 -) 男, 湖南人, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。

表 1 本研究的 12 个居群的样品来源

Table 1 Accessions of 12 populations for ISSR analysis

Population	Sample size/N	Latitude/N	Longitude/E	Population	Sample size/N	Latitude/N	Longitude/E
YN Jianshui	20	23°24'	102°53'	YN Mengzi	22	23°02'	103°21'
YN Kaiyuan	16	23°50'	103°21'	YN Shizong	6	24°35'	104°04'
GX Longlin	20	24°40'	104°52'	GZ Tingxi	19	24°59'	105°18'
YN Luoping	22	24°43'	104°28'	GZ Wangfeng	14	24°55'	105°03'
YN Luxi	16	24°30'	103°58'	GZ Xingyi	20	24°52'	105°01'
YN Milei	20	24°16'	103°38'	GZ Yangping	20	24°56'	104°59'

YN is the code for Yunnan; GX is for Guangxi; GZ is for Guizhou

1.2 DNA 的提取和 PCR 的扩增

采用 CTAB 法 (Doyle 等, 1991) 提取总 DNA。

PCR 扩增的条件: (1) 20 μ l 的反应体系: 2.0 μ l 10 $\times$ buffer, 约 20 ng DNA, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol dNTPS, 200 nmol 引物 (来自哥伦比亚大学设计的 100 个引物), 2% 甲酰胺和 1 单位 Taq 酶, 再加双蒸水至 20 μ l。(2) 扩增程序: 先 94℃ 5 min, 再如下条件 35 个循环: 94℃ 30 s $\rightarrow$ 48℃ 45 s $\rightarrow$ 72℃ 1.5 min, 最后在 72℃ 的条件下延伸 7 min。(3) 电泳条件: 取样 10 μ l, 1.5% 琼脂糖胶加 0.5% EB, 1 $\times$ TAE 缓冲液和 4V/cm 的电泳电压。

1.3 数据分析

居群遗传变异以常规的多态位点百分率 (PPB), 等位基因平均数 (A), 平均期望杂合度 (H_e) 和观察杂合度 (H_o) 度量。居群之间的遗传分化和遗传相似性采用 Nei 基因分化系数 (G_{ST}) 和标准遗传距离 (D) 来衡量。以上各遗传参数的意义和计算方法详见文献 (Nei, 1975)。

2 实验结果

2.1 引物筛选结果

从哥伦比亚大学提供的 100 个 ISSR 引物中, 经过筛选, 选取了 11 个能够扩增出清晰而且相对较多条带的引物, 分别是 UBC # 807, 808, 810, 811, 813, 835, 836, 840, 842, 843 和 857 (表 2) (图 1, 2)。

表 2 被选用的 11 个引物

Table 2 11 primers used in analysis

No.	Sequence	No.	Sequence
807	AGAGAGAGAGAGAGT	836	AGAGAGAGAGAGAGYA
808	AGAGAGAGAGAGAGC	840	GAGAGAGAGAGAGAYT
810	GAGAGAGAGAGAGAT	842	GAGAGAGAGAGAGAYG
811	GAGAGAGAGAGAGAC	843	CTCTCTCTCTCTCTRA
813	CTCTCTCTCTCTCTT	857	ACACACACACACACYG
835	AGAGAGAGAGAGAGYC		

2.2 遗传多样性与群体遗传分化

对贵州苏铁的 12 个自然居群的群体遗传分析表明: 总体而言, 遗传多样性水平比较低。在总共检测到清晰而且可重复的 78 个有效位点当中, 多态位点只有 28 个, PPB 是 35.90%。物种等位基因平均数 (A) 是 1.3590, 物种平均期望杂合度 (H_e) 和观察杂合度 (H_o) 分别是 0.1082 和 0.1686。从各个居群来看, 以师宗居群的遗传多样性水平最低, 建水居群的最高。各个居群的遗传多样性水平的几个指标列于表 3。

各个居群之间的 Nei 基因分化系数 (G_{ST}) 是 0.4321; 标准遗传距离 (D) 是 48.75%。两个衡量指数相互支持, 共同说明了贵州苏铁的各个居群之间存在着较为强烈的遗传分化。

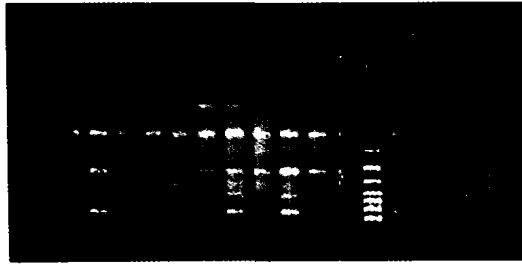


图 1 引物 UBC # 807 对 YN Kaiyuan 居群部分样品
扩增出的产物图谱

Fig. 1 Part of electrophoresis of PCR products of Population
YN Kaiyuan via UBC # 807

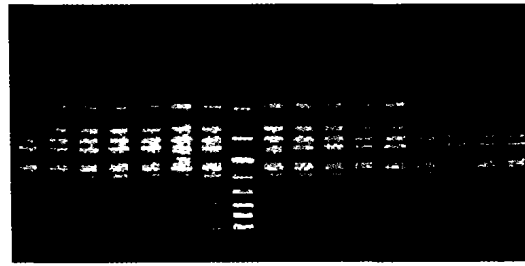


图 2 引物 UBC # 835 对 GZ Yangping 居群部分样品
扩增出的产物图谱

Fig. 2 Part of electrophoresis of PCR products of Population
GZ Yangping via UBC # 835

表 3 贵州苏铁各个居群的 ISSR 分析结果

Table 3 Genetic variability within populations of *Cycas guizhouensis* by ISSR analysis

Population	N	PPB/%	A_o	H_e	H_o
YN Jianshui	20	20.51	1.2051 (0.4064)	0.0884 (0.1796)	0.1270 (0.2579)
YN Kaiyuan	16	15.38	1.1538 (0.3631)	0.0668 (0.1595)	0.0961 (0.2282)
GX Longlin	20	14.10	1.1410 (0.3503)	0.0551 (0.1426)	0.0807 (0.2064)
YN Luoping	22	15.38	1.1538 (0.3631)	0.0720 (0.1704)	0.1016 (0.2402)
YN Luxi	16	11.54	1.1154 (0.3216)	0.0500 (0.1405)	0.0719 (0.2014)
YN Milei	20	16.67	1.1667 (0.3751)	0.0698 (0.1588)	0.1013 (0.2295)
YN Mengzi	22	15.38	1.1538 (0.3631)	0.0637 (0.1524)	0.0928 (0.2206)
YN Shizong	6	08.97	1.0897 (0.2877)	0.0366 (0.1217)	0.0531 (0.1744)
GZ Tingxi	19	16.67	1.1667 (0.3751)	0.0687 (0.1577)	0.1000 (0.2276)
GZ Wangfeng	14	10.26	1.1026 (0.3054)	0.0426 (0.1298)	0.0619 (0.1865)
GZ Xingyi	20	11.54	1.1154 (0.3216)	0.0492 (0.1396)	0.0710 (0.1999)
GZ Yangping	20	14.10	1.1410 (0.3503)	0.0531 (0.1366)	0.0789 (0.2002)
Mean		14.21 (3.21)	1.1421 (0.032)	0.0597 (0.0145)	0.0864 (0.0206)
Species	215	35.90	1.3590	0.1082	0.1686

N, sample size; PPB, percentage of polymorphic loci; A_o , observed number of alleles per locus; H_e , expected heterozygosity; H_o , observed heterozygosity.

3 讨论

3.1 关于分子标记 ISSR

ISSR 是简单重复序列之间的序列片段的 PCR。以往对于遗传多样性的研究较多地运用等位酶、RAPD、RFLP、AFLP 和 SSR 等方法,但这些方法都有各自的局限,如 RAPD 的重复性差而 AFLP 操作复杂,耗时费力等(周奕华等,1999)。分子标记 ISSR 克服了它们的一些不足,并已经被广泛地应用到农作物、果树和保护生物学中的遗传多样性的评价当中(Hao 等,2002)。在真核生物基因组中简单重复序列不仅十分丰富,而且进化快(Xu & Sun, 2001),这样就使得分子标记 ISSR 产物的信息量大、多态性高。这些是等位酶、甚至是 RAPD 所不及的。相对于应用最普遍的 RAPD,ISSR 具备了它所有的优势,而且还因为引物较长,退火温度较高,能够扩增出更加可靠的、可重复的条带,表现出很好的稳定性(Nagaoka & Ogihara, 1997);相对于 RFLP、AFLP 和 SSR,ISSR 虽通常不是共显性的,但易于操作,无论是对技术的还是对经济的要求都明显较低。苏铁尽管古老,是最为原始的裸子植物,但其遗传多样性通常都很低,给检测造成了一定的困难。但在我们的实验中,被选用的 11 个 ISSR 引物不但平均扩增出了 7.1 条清晰而稳定的带,而且具有相当高的多态性(PPB 值为 35.90%)。这说明了分子标记 ISSR 适合于

诸如苏铁等遗传多样性比较低的植物类群遗传多样性的研究。

3.2 贵州苏铁的遗传多样性和遗传分化

Hamrick 等 (1992) 总结了 662 种植物的遗传多样性和遗传分化所得出的平均值是: $PPB = 51.3\%$, $A = 1.97$, $H_e = 0.150$, $G_{ST} = 0.228$; 而其中裸子植物的平均值相对较高, 分别是: $PPB = 71.1\%$, $A = 2.38$, $H_e = 0.169$, $G_{ST} = 0.073$ 。贵州苏铁 12 个自然居群的遗传多样性参数分别为 $PPB = 35.90\%$, $A = 1.3590$, $H_e = 0.1082$ 。与 Hamrick 等所得出的平均值相比, 12 个贵州苏铁自然居群的遗传多样性水平参数偏低, 明显低于裸子植物的平均值; 而遗传分化参数 ($G_{ST} = 0.4321$) 却明显偏高。总的来说, 贵州苏铁呈现出了整体遗传多样性低而居群之间的遗传分化大的特点。相类似的结果也出现在其它苏铁类植物的遗传多样性研究中, 如 *Macrozamia communis* (Ellstrand 等, 1990), *Zamia pumila* (Walters & Decker-Walters, 1991), 蓖齿苏铁 (*C. pectinata*) (Yang & Meerow, 1996), 攀枝花苏铁 (*C. panzhihuaensis*) (Yang & Meerow, 1999) 和 *C. seemannii* (Keppel 等, 2002)。这一结果与裸子植物的有利于维持高水平的遗传变异和低水平的居群间分化的生活史特征 (El-Kassaby, 1991) 是不相符的。造成这一结果的可能原因是: (1) 经历 2 亿多年生存繁衍的贵州苏铁很可能在某一历史时期 (如第四纪冰期) 遭遇过严重的遗传瓶颈效应而丧失了大量的遗传多样性。在这一过程后, 原本分布广泛的贵州苏铁只是随机地残留下来了极为有限的个体和居群, 这些极为有限的个体和居群艰难地发展成现在的个体和居群。建立者效应导致了居群间的遗传分化增大。(2) 贵州苏铁的现有居群的个体数量普遍很小, 多数居群的个体不超过 50。小居群的遗传效应是导致遗传漂变和增加了近交 (Barrett & Kohn, 1991; Ellstrand & Elam, 1993; Ge 等, 1998)。(3) 传粉和种子散布是基因交流的两种主要途径。Yang & Meerow (1996) 的研究结果表明, 苏铁植物的传粉主要依靠虫媒, 种子散布则依靠重力和啮齿类动物, 基因流的有效距离为 2~7 km。贵州苏铁呈星散状分布, 居群间的距离通常大于 30 公里。远相距阻碍了居群之间的基因交流。这样, 一方面导致居群内的遗传多样性小, 另一方面各居群适应其各自的生境而形成较强的遗传分化。

3.3 保护策略

Frankel 等 (1995) 指出: 有效种群大小为 50 个个体的种群被认为是维持足够等位基因丰度的最小限制; 而有效种群大小为 500 个个体的种群才足以维持种群内数量性状的遗传变异, 以及种群对未来环境变化的适应能力。尽管贵州苏铁现有 10 多个野生居群, 但每个居群的个体数量都较少, 大多数居群的个体数少于 50, 且没有一个居群的个体数达到 500。因此, 要有有效的保护这一植物首先是要解除它所面临的确定性威胁, 如生境片段化和过度采集等; 同时, 要加强自然居群的恢复工作, 即通过人工繁殖来培育幼苗, 再回归自然, 以壮大自然居群。

物种或居群的遗传多样性水平能够反映它在不断变化的环境中的生存能力的大小。一个物种或居群如果没有足够的遗传多样性, 就无法适应其生存环境的变化; 反之, 一个物种或居群的遗传多样性越丰富, 它对环境变化的适应能力和进化潜力就越大, 也就越容易扩展分布范围和开拓新的环境 (杨持等, 2002)。因此, 保护生物学的一个主要目的是保护生物的遗传多样性 (Ge 等, 2003)。根据贵州苏铁的遗传多样性的特点, 在就地保护时, 为提高自然居群的遗传多样性水平, 要辅以各种人工的办法以促进各个居群之间的基因交流, 如居群之间的人工授粉和个体的迁移等; 在人工繁育和迁地保护时, 树苗的选取不仅要优先考虑遗传多样性相对较高的居群 (如 YN Jianshui 居群), 而且还要尽可能地来自不同的居群, 以促进基因流最广泛的交流, 并最终达到提高遗传多样性水平和增强该物种的生存、适应能力的目的。

〔参 考 文 献〕

- 邓朝义, 1999. 两种野生苏铁多样性变异研究 [J]. 贵州林业科技, 27 (2): 48—49
杨成华, 张延忠, 方小平等, 1996. 贵州苏铁的研究 [J]. 贵州林业科技, 24 (4): 31—33

- 杨持, 王迎春, 刘强等, 2002. 四和木保护生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 127
- 葛颂, 洪德元, 1994. 遗传多样性及其检测方法 [A]. 见: 钱迎倩, 马克平主编. 生物多样性的原理和方法 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 123—140
- Barrett SCH, Kohn JK, 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation [A]. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. Genetics and conservation of rare plants [M]. New York: Oxford University Press, 3—30
- Doyle J, 1991. DNA protocols for plants—CTAB total DNA isolation [A]. In: Hewitt, GM, Johnston A. (Eds.), Molecular Techniques in Taxonomy [M]. Berlin: Springer, 283—293
- El-Kassaby YA, 1991. Genetic variation within and among conifer populations: review and evaluation of methods [A]. In: Sineschi S, Maluoli ME, Cannata F. *et al* eds., Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees [M]. The Netherlands: Academic Publishing, 61—76
- Ellstrand NC, Elam DR, 1993. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 217—242
- Ellstrand NC, Ornduff R, Clegg JM, 1990. Genetic structure of the Australian cycad, *Macrozamia communis* (Zamiaceae) [J]. *Amer J Bot*, 77: 677—681
- Frankel OH, Brown AHD, Burdon JJ, 1995. The conservation of plant biodiversity [M]. Cambridge MA: Cambridge University Press
- Hao G, Lee DH, Lee JS, *et al*, 2002. A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 43: 63—68
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. *New For*, 6: 95—124
- Ge S, Hong DY, Wang HQ, *et al*, 1998. Population genetic structure and conservation of an endangered conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae) [J]. *Int J Plant Sci*, 159 (2): 351—357
- Ge XJ, Yu Y, Zhao NX, *et al*, 2003. Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae) [J]. *Biological Conservation*, 111: 427—434
- Keppel G, Lee SW, Hodgskiss PD, 2002. Evidence for long isolation among populations of a pacific cycad: genetic diversity and differentiation in *Cycas seemannii* A. Br. (Cycadaceae) [J]. *J Heredity*, 93: 133—139
- Nagaoka T, Oghara Y, 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 94: 597—602
- Nei M, 1975. Molecular Population Genetics and Evolution [M]. New York: Elsevier
- Walters TW, Decker-Walters DS, 1991. Patterns of allozyme diversity in the west Indies cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae) [J]. *Amer J Bot*, 78: 436—445
- Xu FX, Sun M, 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain *Amaranthus* and their wild relatives (*Amaranthus*; *Amaranthaceae*) Using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent inter-simple sequence repeat markers [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21 (3): 372—387
- Yang SL, Meerow AW, 1996. The *Cycas pectinata* (Cycadaceae) complex structure and gene flow [J]. *International J Plant Sci*, 157: 468—483
- Yang SL, Meerow AW, 1999. Genetic variation in Chinese cycad population [A]. In: Chen CJ, ed. Biology and Conservation of Cycads—Proceedings of the Fourth International Conference on Cycad Biology [C]. Beijing: International Academic Publishers, 175—186
- Zhou YH (周奕华), Chen ZH (陈正华), 1999. Development and application of molecular markers in botany [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 17 (1): 75—86