

## 濒危植物三棱栎遗传多样性的 RAPD 分析\*

韩春艳<sup>1,2</sup>, 孙卫邦<sup>1\*\*</sup>, 高连明<sup>1</sup>

(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 用随机扩增多态 DNA (RAPD) 标记对 5 个三棱栎 (*Trigonobalanus doichangensis*) 居群共 99 个个体进行遗传多样性和居群遗传结构分析。16 个引物共检测到 157 个位点, 其中多态位点 83 个, 占 52.87%。物种水平 Shannon 多样性指数  $I = 0.2431$ , Nei 基因多样性  $h = 0.1595$ , 种内总遗传变异量  $Ht = 0.1600$ , 居群内遗传变异量  $Hs = 0.0749$ , 居群间变异量大于居群内变异量, 表明三棱栎的遗传变异主要存在于居群之间。与同科植物相比, 三棱栎遗传多样性较低, 遗传分化系数  $Gst = 0.5320$ , 说明居群间的遗传变异占 53.20%, 居群间已出现强烈的遗传分化。当地人的强烈活动造成的生境破碎化和居群隔离, 以及三棱栎演化过程中的地史变化对其种群发展的影响等, 可能是造成其居群间强烈的遗传分化和较低遗传多样性的原因。基于本研究结果, 提出了三棱栎遗传多样性的保护策略。

**关键词:** 三棱栎; RAPD; 遗传多样性; 居群遗传结构; 保护

**中图分类号:** Q 943      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2700(2004)05-0513-06

## Analysis of Genetic Diversity of *Trigonobalanus doichangensis* (Fagaceae) by RAPD\*

HAN Chun-Yan<sup>1,2</sup>, SUN Wei-Bang<sup>1\*\*</sup>, GAO Lian-Ming<sup>1</sup>

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

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)*

**Abstract:** The genetic diversity and population genetic structure of five populations with total of 99 *Trigonobalanus doichangensis* individuals were estimated with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. One hundred and fifty-seven loci were amplified with 16 oligonucleotide primers, of which 83 loci (52.87%) were polymorphic. Shannon's information index ( $I$ ) and Nei's gene diversity ( $h$ ) were 0.2431 and 0.1595 respectively at the species level. Total genetic diversity ( $Ht$ ) was 0.1600, and the genetic diversity within populations ( $Hs$ ) was 0.0749. The genetic variation between different populations accounted for 53.20% of the total. This indicated that genetic variation existed mainly between populations rather than within populations. In comparison with other species from Fagaceae, the genetic diversity of *T. doichangensis* is lower and the gene flow among populations is very restricted. These may be attribut-

\* 基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-SW-104), 西南野生生物种质 DNA 库资源收集保存的前期研究

\*\* 通讯作者: Tel: 0871-5223622      E-mail: wbsun@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2004-01-08, 2004-05-14 接受发表

作者简介: 韩春艳 (1979-) 女, 硕士生, 主要从事保护生物学研究。

ed to the changes of environment during the species evolution, habitat destruction and excessively making use of the species resources by the people. Based on the research results, the conservation strategies of genetic diversity for the species were put forward.

**Key words:** *Trigonobalanus doichangensis*; RAPD; Genetic diversity; Population genetic structure; Conservation

三棱栎 [*Trigonobalanus doichangensis* (A. Camus) Forman] 是壳斗科三棱栎属的一种常绿乔木, 受国家二级重点保护。由于其分布区域狭窄, 植株稀少, 又因砍伐森林和毁林开荒, 处于濒危状态 (傅立国, 1992)。目前的调查研究表明, 三棱栎在我国云南省的澜沧、沧源、孟连、西盟和泰国北部 Chiangrai 等地仍有小面积分布, 但其生境严重破碎化, 种群极为脆弱 (孙卫邦等, 2004)。几年来, 国内一些学者对三棱栎的系统分类和植物区系成分都进行了不同程度的研究 (吴树明和肖绍琼, 1989; 李捷, 1994; 王萍莉等, 1998), 对其致濒因素和保护对策也进行了一定程度的探讨 (周元等, 2003; 孙卫邦等, 2004), 但尚未见有关三棱栎遗传多样性研究的报道。

生物多样性保护的关键之一是保护物种, 更具体地说是保护物种的遗传多样性或进化潜力。种内遗传多样性愈丰富, 物种对环境变化的适应能力愈大, 其进化的潜力也就愈大。只有掌握物种多样性水平高低及其群体的遗传结构, 才能制定有效的保护策略和措施 (祖元刚等, 1999)。为了有效保护三棱栎的遗传多样性, 深刻揭示其濒危机制和制定科学的保育策略, 迫切需要研究其遗传变异情况和居群遗传结构。

随机扩增多态 DNA (RAPD) 标记 (Williams 等, 1990) 从 20 世纪 90 年代开始, 逐渐应用于居群研究, 尤其是濒危植物方面 (Elena 等, 2003)。RAPD 具有检验潜在多态位点和对基因组比等位酶更为随机取样的优点 (Fritsh & Rieseberg, 1996), 与其它 DNA 分子标记相比, RAPD 的花费更少, 技术更简单, 也无需预知目的基因组序列 (Elena 等, 2003)。因此, 本研究我们采用 RAPD 技术, 研究三棱栎的遗传变异和居群遗传结构, 拟探讨以下问题: ①在这一物种中存在多少遗传变异? ②是否所有的居群具同等变异? ③居群内遗传变异占整个物种遗传多样性多大的比重? ④居群间的基因流状况以及⑤三棱栎的濒危是否与其遗传多样性有关。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选取云南的 4 个居群和泰国的 1 个居群为研究对象 (图 1), 用生态学方法随机从每个居群内选取 19~20 植株进行研究材料的采集, 植株间距离至少间隔 20 m。采集的新鲜嫩叶用变色硅胶快速干燥, 带回实验室在 4℃冰箱中保存备用。

### 1.2 总 DNA 提取

总 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法。取 1~2 g 硅胶干燥叶片, 液氮研磨成粉末状, 总 DNA 均用 TE buffer 悬浮, RNA 酶 A 进行纯化, 然后在 1.5% 含 EB 的琼脂糖凝胶上电泳检测 DNA 质量, 用紫外分光光度计在 260 nm 和 280 nm 下测定 OD 值, 确定 DNA 的纯度和浓度, 将总 DNA 稀释到约 10 ng/μl 作为 PCR 扩增反应的模板。

### 1.3 PCR 扩增

用筛选出的 16 个引物对所有个体的 DNA 进行 PCR 扩增 (表 1)。扩增反应在 T3 thermocycler (Biomotra

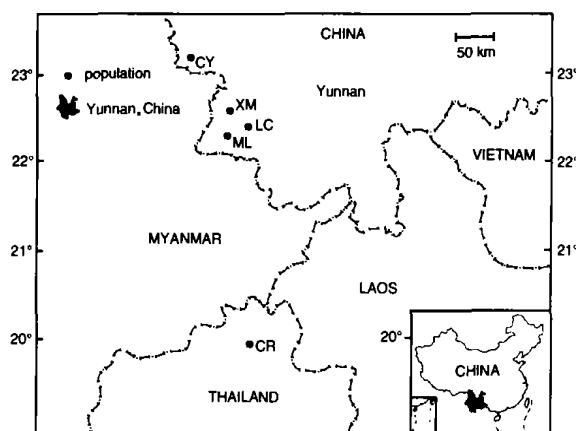


图 1 三棱栎居群分布图

Fig. 1 The sampled populations of *T. doichangensis*

CY: 沧源 Cangyuan; XM: 西盟 Ximeng; LC: 澜沧 Lancang;  
ML: 孟连 Menglian; CR: 泰国清莱 Chiang-Rai of Thailand

German) PCR 反应仪上进行, 反应体积为 20  $\mu$ l, 其中成分为: 2  $\mu$ l 10 ng/ $\mu$ l DNA 模板, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ mol/L dNTP, 2  $\mu$ l 10 $\times$  Reaction Buffer (MgCl<sub>2</sub>-Free), 2.5  $\mu$ mol/L 引物, 2U TaqDNA 聚合酶。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min 预变性, 然后 94 $^{\circ}$ C 15 s, 36 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s 进行 45 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min。取 10  $\mu$ l 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB) 上电泳约 3 h, 以 Gene RulerTM 100 bp DNA ladder plus (MBI Fermentas 公司) 作为相对分子量标准, 使用 GekDoc2000 (BIORAD 公司) 图像分析仪观察并照相。

#### 1.4 数据处理

RAPD 是显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为是等分子量的扩增带 (邹喻莘等, 2001), 相对迁移距离相同的条

带为一个 RAPD 标记 (姜自锋等, 2002), 同一位点的产物按扩增阳性 (1) 和扩增阴性 (0) 记录电泳图谱, 形成二元数据矩阵 (钱韦等, 2000; 朱其惠等, 2002), 将矩阵输入 POPGENE 软件进行分析。表征遗传多样性与居群遗传结构的参数包括:  $na$  平均每个位点测定到的等位基因数,  $ne$  平均每个位点的等位基因的有效数目,  $P$  (%) 多态位点百分率,  $I$  为 Shannon 表型多样性指数,  $h$  为 Nei 的基因多样性指数, Nei 的遗传分化指数  $Gst$  和居群每代迁移数  $Nm$ 。

表 1 用于三棱栎遗传多样性检测的寡核苷酸引物的序列及其检测的位点数

Table 1 The sequences of random oligonucleotide primers and the number of tested loci

Primers	Sequences	Total bands	Polymorphic bands	Primers	Sequences	Total bands	Polymorphic bands
OPC05	TCGTCGCCC	9	4	OPM16	GTAACCAGCC	13	7
OPC14	TGCGTGCTTG	10	5	OPM20	AGGTCTTGGG	10	4
OPC15	GACGGATCAG	11	6	OPN14	TCGTGCGGGT	12	9
OPJ09	TGAGCCTCAC	11	6	OPN20	GGTGCTCCGT	7	3
OPM02	ACAACGCCTC	6	0	OPS03	CAGAGGTCCC	11	6
OPM06	CTGGGCAACT	8	5	OPV06	ACGCCAGGT	10	9
OPM13	GGTGGTCAAG	10	4	OPV10	GGACCTGCTG	9	4
OPM15	GACCTACCAC	12	5	OPV15	CAGTGCCGGT	8	6

## 2 实验结果

### 2.1 三棱栎不同群体 RAPD 产物的多态性

16 个引物共扩增出 157 条带, 长度在 100~2900 bp 之间, 每个引物产生 6~13 条, 平均每个引物产生 9.81 条带 (表 1)。其中 83 条扩增带具有多态性 (表 1), 占 PCR 扩增带总数的 52.87% (表 2), 这一结果说明三棱栎物种水平上的遗传多样性较丰富。但澜沧和泰国 Chiangrai 居群多态性位点比率远远低于沧源、孟连和西盟 3 个居群 (澜沧最低, 为 10.19%) (表 2), 说明澜沧和泰国 Chiangrai 两个居群内遗传变异水平比其它 3 个居群的变异水平低。

### 2.2 遗传多样性水平和居群分化程度

表 2 示三棱栎居群结构与遗传多样性的一些指标。在物种水平上, 等位基因的有效数目  $ne$ 、Shannon 表型多样性指数  $I$  和 Nei 的基因多样性系数  $h$  分别为 1.2646、0.2431 和

0.1595, 等位基因有效数目平均数小于 1.5, 表明三棱栎遗传多样性水平并不高。三棱栎总的遗传变异量  $H_t$  为 0.1600, 其中居群内遗传变异量  $H_s$  为 0.0749, 表明三棱栎居群间遗传变异水平明显高于居群内遗传变异水平, 各居群间的遗传分化系数  $G_{st}$  达到 0.5320, 即在总的遗传变异中有 53.20% 的变异存在于居群间, 各居群已出现强烈的遗传分化。在居群间每代迁移数  $N_m$  为 0.4398, 说明各居群间存在极少的基因交流。

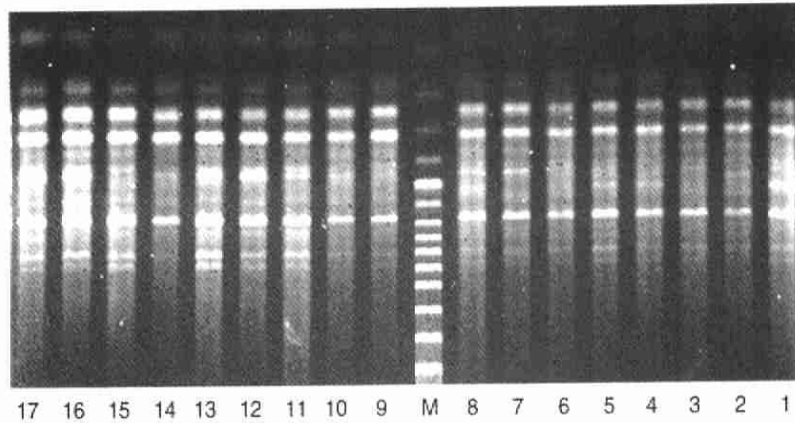


图 2 引物 OPC15 扩增的三棱栎澜沧居群的 DNA 片段图谱 (澜沧居群)

Fig. 2 The PCR amplification pattern of *Trigonobalanus doichangensis* Lancang population generated with primer OPC15

表 2 三棱栎遗传多样性与居群遗传结构

Table 2 The genetic diversity of *T. doichangensis* and genetic structure of its population

Population	$n_a$	$n_e$	$h$	$I$	$P/\%$	$H_t$	$H_s$	$G_{st}$	$N_m$
LC	1.1019	1.0538	0.0311	0.0472	10.19				
CHR	1.1911	1.0804	0.0513	0.0812	19.11				
CY	1.3185	1.1675	0.0985	0.1502	31.85				
ML	1.2930	1.1469	0.0911	0.1403	29.30				
XM	1.3312	1.1696	0.1024	0.1568	33.12				
Mean	1.5287	1.2646	0.1595	0.2431	52.87	0.1600	0.0749	0.5320	0.4398

$n_a$ , observed number of alleles;  $n_e$ , effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)];  $h$ , Nei's (1973) gene diversity;  $I$ , Shannon's Information index [Lewontin (1972)];  $H_t$ , gene diversity of species;  $H_s$ , gene diversity within populations;  $N_m$ , gene flow;  $G_{st}$ , coefficient of gene differentiation;  $P$ , the percentage of polymorphic loci

### 3 讨论

壳斗科植物多数为风媒植物, 该科植物大多数都有很高的遗传多样性。如栲树 (*Castanopsis fargesii*) 遗传多样性的 RAPD 分析显示其多态位点百分率 ( $P$ ) 为 40.78%, 种内基因多样性指数  $h$  为 0.296, Shannon 表型多样性指数  $I$  为 0.4597, 总的遗传变异量  $H_t$  为 0.2959, 遗传分化系数  $G_{st}$  仅 0.0429, 而居群间的每代迁移数  $N_m$  达到了 11.2645 (朱其惠等, 2002), 遗传多样性水平高, 居群间的基因交流非常频繁。李文英等 (2003) 对蒙古栎 (*Quercus mongolica*) 的 AFLP 分析发现其多态位点百分率 ( $P$ ) 为 96.8%, Shannon 指数  $I$  为 0.246, 夏铭等 (2001) 对蒙古栎的 RAPD 分析也得到了 71.22% 的多态位点百分率, 可见蒙古栎的种内遗传变异水平也很高。Creaf 等 (1998) 用 RAPD 技术对无柄栎 (*Quercus petraea*) 9 个单株的 193 个子代个体的研究表明, 总遗传变异量  $H_t$  为 0.406,  $H_s$  为 0.298。对板栗 (*Castanea*

*mollissima*) 46 个品种样品的 RAPD 分析后发现 (高捍东, 2001), 其多态位点百分率  $P$  为 58%, 基因多样性  $h$  为 0.3618, Shannon 指数为 0.4832。除此之外, 壳斗科其它植物的同工酶研究中也表现出很高的遗传多样性 (陈小勇等, 1997; 郎萍和黄宏文, 1999)。比较发现, 虽然三棱栎的多态位点百分率达到 52.87%, 但其遗传变异水平明显低于栲树、蒙古栎、无柄栎等壳斗科植物种类, 且有过半的遗传变异存在于居群之间 ( $H_s = 0.0749$ )。

壳斗科植物遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 范围通常为 0.020 ~ 0.065, 分化程度都不大, 这与花粉传播距离比较远和种群间基因流强度较大有关 (陈小勇等, 1997)。有关研究报告显示, 栲树 ( $G_{st}$  为 0.0429) (朱其惠等, 2002)、蒙古栎 ( $G_{st} = 0.077$ ) (李文英等, 2003)、无柄栎 ( $G_{st} = 0.272$ ) (Creaf 等, 1998) 和川滇高山栎 (*Quercus aquitolioides*) ( $G_{st} = 0.167$ ) (李进等, 1997) 等的基因流水平都很高, 且遗传分化水平很低。而三棱栎遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 达到了 0.5320, 高出上述植物的数倍, 接近于自交种遗传分化的平均水平 ( $G_{st} = 0.510$ ) (邹喻莘等, 2001)。此外, 当居群间每代迁移数  $N_m > 1$  时, 基因流就可以防止由于遗传漂变引起的居群之间的遗传分化 (王中仁, 1996), 而三棱栎  $N_m$  只有 0.4398, 其居群间的基因交流极为有限, 居群间的遗传分化水平很高。三棱栎居群间高度的遗传分化水平, 可能与其生境破碎化造成的各居群彼此孤立有关。

本研究结果还显示, 三棱栎居群间的遗传分化程度和其目前地理分布格局 (图 1) 没有直接的联系。三棱栎目前的遗传多样性水平和居群遗传结构特征可能还与该物种起源的古老性和物种演化进程中地史变化有关。根据化石资料, 欧洲和北美在古新世至始新世有三棱栎属的化石分布, 这说明三棱栎属在第三纪或以前分布就十分广泛, 在晚第三纪中美洲和北美重新连接后, 扩散至哥伦比亚, 之后三棱栎属由于地质地理和古气候等原因在北美和欧洲绝灭而形成了今天的分布格局 (周浙昆, 1999)。目前, 三棱栎居群的规模都不大, 即使在保护良好的自然保护区内的原始植被中, 三棱栎也常呈片状或小斑块镶嵌于常绿阔叶林中 (孙卫邦等, 2004)。可以推测, 现有三棱栎居群分布格局的形成, 除人为干扰外, 很可能还与演化进程中的地质地理、古气候和环境变迁等因素有关。由于地史变化和环境变迁, 使得三棱栎在某一时期的个体数量大量下降, 分布区域逐步缩小, 居群不断孤立。这种孤立的三棱栎小群体内, 容易发生遗传漂变、近交衰退及适应性降低等现象, 使三棱栎的遗传多样性不断散失。目前, 对三棱栎分布区内原生植被的破坏和对三棱栎资源的过度利用, 将会加剧其遗传多样性丢失的进程, 若不采取科学的保育策略, 脆弱的三棱栎种群会有灭绝的可能。

三棱栎有胚果实的比率虽然很低, 但发育完好的种子萌发情况很好, 幼苗成活率也高 (周元等, 2003); 同时被破坏的三棱栎种群若能得到保护, 其种群能逐步自我恢复 (孙卫邦等, 2004)。因此, 就地保护好现有三棱栎的每一个单株和居群, 促使其种子自然萌发后实现种群的扩增, 是保护和丰富三棱栎的遗传多样性的重要措施之一。此外, 还应依据三棱栎遗传多样性的分析结果, 从不同居群内采种育苗后, 尽快开展其种群的人工重建和种质资源异地保育工作。

**致谢** 承蒙泰国清迈皇家植物园园长 Weerachai Nanakorn 博士帮助采集泰国居群材料; 在野外工作中, 本所孔繁才先生、周元先生、李崇仁先生及沧源南滚河国家自然保护区保护局的陈革局长、赵金超先生和李春华同志给予了帮助。

## [参 考 文 献]

- 王中仁, 1996. 植物等位酶分析 [M]. 北京: 科学出版社, 157—158
- 邹喻苹, 葛颂, 王晓东等, 2001. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 41—43
- 祖元刚, 张文辉, 阎秀峰等, 1999. 濒危植物裂叶沙参保护生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 125
- 傅立国主编, 1992. 中国植物红皮书—稀有濒危植物 (第1册) [M]. 北京: 科学出版社, 211—212
- Chen XY (陈小勇), Wang XH (王希华), Song YC (宋永昌), 1997. Genetic diversity and differentiation of *Cyclobalanopsis glauca* populations in East China [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **39** (2): 149—155
- Creef BD, Triest L, Cuyper BD, *et al*, 1998. Assessment of intraspecific variation in half-sibs of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. 'plus' trees [J]. *Heredity*, **81**: 284—290
- Elena T, Jose MI, Cesar P, 2003. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): Allozyme and RAPD analysis [J]. *Amer J Bot*, **90**: 85—92
- Fritsch P, Rieseberg LH, 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In Smith TB and Wayne RK [eds], *Molecular Genetics Approaches in Conservation Genetics* [M]. New York: Oxford University Press, 54—73
- Gao HD (高捍东), 2001. Genetic analysis of cultivars of chestnut (*Castanea mollissima*) by the technique of RAPD [J]. *J Jiangsu Forest Sci Tech* (江苏林业科技), **28** (4): 1—3
- Jiang ZF (姜自锋), Lin NQ (林乃铨), Xu M (徐梅), 2002. A review on some technical problems in RAPD application [J]. *J Fujian Agri Forest Univ* (福建农林大学学报), **31** (3): 356—360
- Lang P (郎萍), Huang HW (黄宏文), 1999. Genetic diversity and geographic variation in natural populations of the endemic *Castanea* Species in China [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **41** (6): 651—657
- Li J (李捷), 1994. A preliminary study on the floristic elements of the community of *Formanordendron doichangensis* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **16** (1): 17—24
- Li J (李进), Chen KY (陈可咏), Li BS (李渤生), 1997. Preliminary study on genetic structure of alpine Oaks in Tibes [J]. *J Beijing Forest Univ* (北京林业大学学报), **19** (2): 93—98
- Li WY (李文英), Gu WC (顾万春), Zhou SL (周世良), 2003. AFLP analysis on genetic diversity of *Quercus mongolica* populations [J]. *Sci Silv Sin* (林业科学), **39** (5): 29—36
- Qian W (钱韦), Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元), 2000. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **42** (7): 741—750
- Sun WB (孙卫邦), Zhou Y (周元), Zhao JC (赵金超), *et al*, 2004. Current distribution, population attributes and biological characters of *Trigonobalanus doichangensis* in relation to its conservation [J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **24** (2): 352—358
- Wang PL (王萍莉), Pu FD (溥发鼎), Zheng ZH (郑中华), 1998. Palynological evidence for Taxonomy of *Trigonobalanus* (Fagaceae) [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **36** (3): 238—241
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, *et al*, 1990. DNA polymorphism amplified polymorphic by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531—6535
- Wu SM (吴树明), Xiao SQ (肖绍琼), 1989. Comparative anatomical studies on the woods of *Castanea* Mill. and *Trigonobalanus* Forman in China [J]. *Guihaia* (广西植物), **9** (4): 341—346
- Xia M (夏铭), Zhou XF (周晓峰), Zhao SD (赵士洞), 2001. RAPD analysis on genetic diversity of natural populations of *Quercus mongolica* [J]. *Sci Silv Sin* (林业科学), **37** (5): 126—133
- Zhou Y (周元), Sun WB (孙卫邦), Li CR (李从仁), 2003. Preliminary study on seed germination of *Trigonobalanus doichangensis* [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), **21** (1): 73—76
- Zhou ZK (周浙昆), 1999. Fossils of the Fagaceae and their implications in systematics and biogeography [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **37** (4): 369—385
- Zhu QH (朱其惠), Pan HX (潘惠新), ZhuGe Q (诸葛强), *et al*, 2002. Analysis of genetic structure of natural populations of *Castanopsis fargesii* by RAPDs [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **44** (11): 1321—1326