

红河大翼橙的遗传多样性分析*

杨 杨^{1,2}, 范眸天¹, 龚 洵^{2**}

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

摘要: 在100个随机引物中选取了13个可扩增出多态性产物的引物,对红河大翼橙6个居群的120个个体进行了ISSR扩增,试验结果表明,红河大翼橙居群之间表现出较高水平的遗传分化,为柑橘遗传资源利用和保护方面提供了分子水平上的依据。

关键词: 红河大翼橙; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S 666.4.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2005)06-0879-03

Genetic Diversity of *Citrus Hongheensis*

YANG Yang^{1,2}, FAN Mou-tian¹, GONG Xun²

(1. College of Horticulture and Landcape, Y A U, Kunming 650201, China;

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: This examination select 13 primers from 100 random primers which could revealed polymorphisms in there 6 populations of *Citrus hongheensis*, the ISSR cycles were carried out in them. The evidence in molecular level was supplied for exploitation and protection of gene resource on *Citrus*.

Key words: *Citrus hongheensis*; ISSR; genetic diversity

红河大翼橙(*Citrus hongheensis* Ye et al.)为20世纪70年代发表的云南特有种^[1],其翼叶宽而长,是本叶的2~3倍;总状花序具花5~9朵,花丝分离,偶有单花,花大型,花径达3~3.5 cm。这些特征显示出红河橙的原始性,它不仅表明云南是柑橘的起源地,同时这个种也是云南柑橘中主要的野生种质资源。对红河大翼橙进行多样性研究将提供有关柑橘遗传资源利用和物种保护方面的依据。ISSR是简单重复序列之间的序列片段PCR,它克服了RAPD重复性差而AFLP操作复杂、耗时费力的不足^[2],现已经被广泛应用于农作物、果树和珍稀濒危植物的遗传多样性研究^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

应用分子标记ISSR对6个红河大翼橙居群(红

河哈提村、红河妥龙、红河阿撒、元江打芒、元江浪头村、元江羊街)的遗传多样性进行了研究(采样情况见表1)。按居群采样,每个居群采集20个个体的嫩叶,经硅胶干燥,室温储藏直到提取DNA。

1.2 方法

采用改良后的CTAB法提取总DNA^[4]。PCR扩增条件是:20 μL反应体系:10×PCR buffer 1.8~2.2 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.8~2.2 μL,3%的甲酰胺,200 nmol引物(哥伦比亚大学设计、上海博亚合成),0.15 nmol dNTPS和1单位的Taq酶,约20 ng DNA,加超纯水至20 μL;扩增程序:94℃ 5 min,1循环;94℃ 45 s→52~54℃ 1 min→72℃ 2 min,36循环;72℃ 7 min,1循环;电泳条件:PCR扩增产物在1.5%的琼脂糖胶上以4 V/cm左右的电压于0.5×TBE缓冲液中电泳分离,在0.5% EB溶液中染色,最后用凝胶成像系统照像(图1)。

收稿日期:2005-04-11

* 基金项目:云南省教育厅基金项目(02ZY039)

** 通讯作者

作者简介:杨杨(1978-)女,云南大理人,在读硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究。

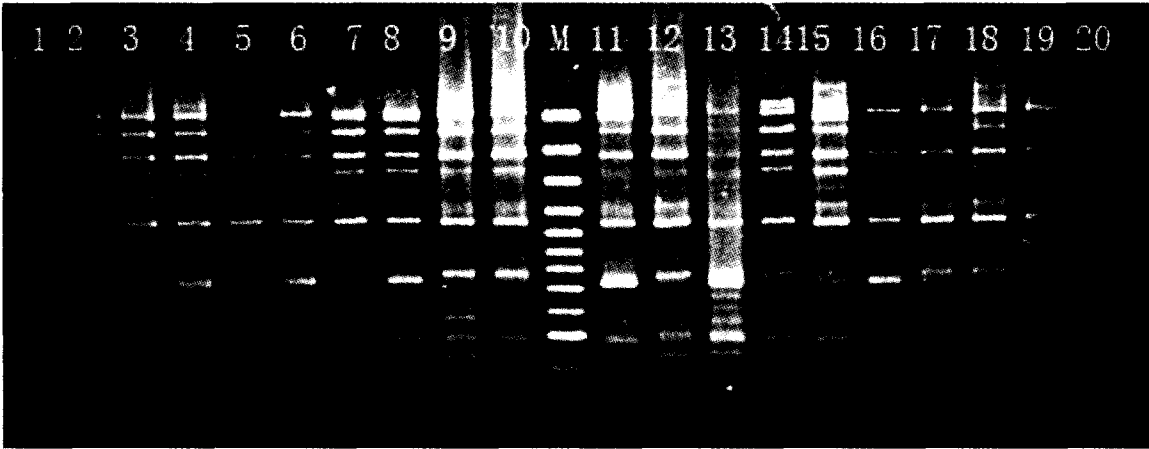


图 1 引物UBC#844对阿撒居群样品扩增出的产物图谱
Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of Population Asa via UBC#844

2 结果与分析

将 ISSR 电泳胶图记录后进行人工读带,以 100 bp DNA ladder 为分子量标准,同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点的产物。按扩增阳性(记为 1)和扩增阴性(记为 0)格式输入计算机构成 ISSR 表型数据矩阵,采用 POP-GENE 软件^[5]计算出红河大翼橙各居群的 Nei's 基因多样性(H)、Shannon 信息指数(I)、多态位点百分比(PPB)、基因分化系数(Gst)、基因流[$N_m = (1 - Gst)/4Gst$]、居群内基因多样性(Hs)和总的基因多样性(Ht)。对红河大翼橙 6 个居群共 120 个个体的群体遗传分析表明:红河大翼橙的遗传多样性水平较高。在总共检测到清晰而且可重复的 242 个有效位点当中,多态位点有 212 个。在居群水平上 Nei's 基因多样性(H)和 Shannon 信息指数(I)分别为

(0.329 2 ± 0.172 0)和(0.485 3 ± 0.231 1)。居群间的遗传分化系数(Gst)达 0.605 1。从各个居群来看,以居群妥龙(PPB = 28.93%)遗传多样性水平最低,居群阿撒和浪头村(PPB = 38.02%)的遗传多样性水平最高。各个居群的遗传多样性水平的几个指标列于表 1。居群内基因多样性(Hs)和总基因多样性(Ht)分别为(0.130 0 ± 0.012 5)和(0.329 2 ± 0.029 6),根据遗传多样性水平在居群内(Hs)和居群间(Ht - Hs)的分化,各个居群之间的 Nei's 基因分化系数[$Gst = (Ht - Hs)/Ht$]是 0.605 1。这说明在物种水平上,有 39.49% 的遗传变异存在于居群内,而有 60.51% 的遗传变异存在于居群间,居群之间表现出较高水平的遗传分化。居群间的基因流(Nm)为 0.163 2,说明居群间的迁移率较小。同时,POPGENE 软件还对各居群进行的聚类分析,结果见图 2。

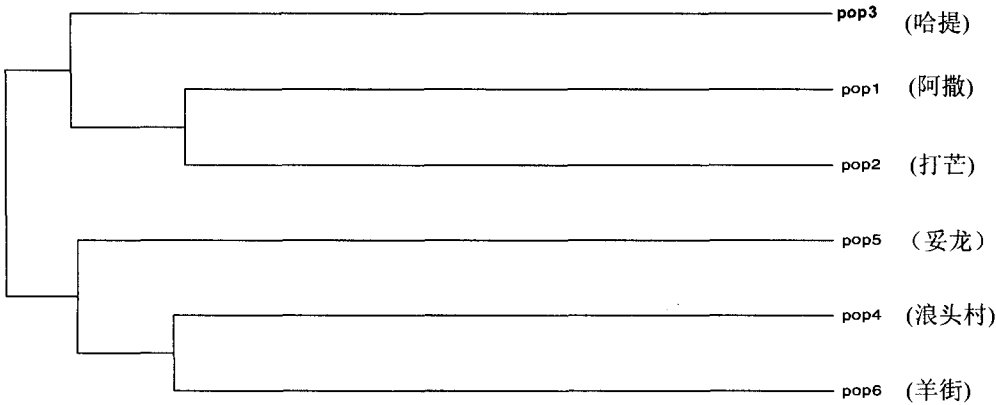


图 2 红河大翼橙居群聚类图
Fig. 2 Endrogram of population of *Citrus hongheensis*

表1 红河大翼橙居群内的遗传多样性分析结果

Tab. 1 Statistical analysis of genetic variation in populations of *Citrus hongheensis*

Population	Na	Ne	H	I	PPB
阿撒	1.380 2 ±0.486 4	1.223 8 ±0.344 7	0.130 6 ±0.188 2	0.195 7 ±0.271 6	38.02%
打芒	1.371 9 ±0.484 3	1.252 8 ±0.374 9	0.142 7 ±0.200 1	0.209 7 ±0.286 4	37.19%
哈提	1.318 2 ±0.466 7	1.228 3 ±0.365 6	0.127 7 ±0.197 4	0.185 8 ±0.282 6	31.82%
浪头村	1.380 2 ±0.484 6	1.240 1 ±0.361 7	0.137 2 ±0.195 9	0.202 9 ±0.281 1	38.02%
妥龙	1.289 3 ±0.454 4	1.198 1 ±0.349 2	0.111 1 ±0.187 9	0.162 7 ±0.269 0	28.93%
羊街	1.351 2 ±0.478 3	1.231 2 ±0.364 3	0.130 8 ±0.195 3	0.192 5 ±0.279 6	35.12%

Na = Observed number of alleles; Ne = Effective number of alleles; H = Nei's gene diversity; I = Shannon's Information index; PPB = percentage of polymorphic loci^[6]

3 讨论

普遍认为稀有的或分布狭窄的物种遗传多样性水平偏低^[7],然而,近年来有研究发现一些特有和濒危物种仍然保持着高水平的遗传变异^[8-14]。通过对红河大翼橙6个居群的ISSR分析得到多态位点百分率(PPB)为87.60%,表明红河大翼橙虽然为分布区狭窄的特有种,但是与一些典型稀有和濒危的物种相比,遗传多样性并不低,比一些典型濒危植物的多态位点百分率要高得多,如贵州苏铁(*Cycas guizhouensis*)只有35.90%^[15],银杉(*Cathaya argyrophylla*)仅为32%^[16]。野外调查发现,红河大翼橙多为房前屋后零星栽植,一般是人为移栽,所以在一个居群中会有不同地区移来的植株,这大概是造成它分布区狭窄却有高水平遗传多样性的原因之一。

[参考文献]

[1] 叶荫民,刘晓东,丁素琴,等. 云南红河橙——柑橘属大翼橙亚属的一个新种[J]. 植物分类学报,1976,14(1): 57-59.

[2] ZHOU Y H, CHEN Z H. Development and application of molecular markers in botany [J]. J Wuhan Bot Res,1999, 17(1):75-86.

[3] HAO G, LEE J S. A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-dimple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Bat Bull Acad Sin, 2002,43: 63-68.

[4] DOYLE J. DNA protocol for plant—CTAB total DNA I-solation[A]. In: Hewitt, GM, Johnston A. (Eds.), Molecular Techniques In Taxonomy [M]. Berlin: Springer, 1991,283-293.

[5] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, et al.. POP-GENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis[J]. Mol. Biol. Biotech. 1997.

[6] NEI M. Molecular Population Genetics and Evolution [M]. New York: Elsevier,1975.

[7] HICKEY R J, VINCENT M A. Gutmann SI Genetic variation in running buffals clover *Trifolium soloniferum*, Fabaceae[J]. Conservation Biology, 1991,(5): 309-316.

[8] RAICHTER T S, SOLTIS D E. Genetic variation within and among populations of the narrow endemic *Delphinium viridescens* (Ranunculaceae) [J]. American journal of botany, 1994,81: 1070-1076.

[9] SMITH J F, PHAN T V. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae) [J]. American Journal of Botany, 1996,83: 717-726.

[10] GE S, ZHANG D M, WANG H Q, et al.. Allozyme variation in *Ophiopogon xylorrhizus*, an extreme endemic species of Yunnan, China. [J]. Conservation Biology, 1997,11: 562-565.

[11] AYRES D R, RYAN F J. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulate* and its congener *W. bilanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques[J]. American Journal of Botany, 1999,86: 344-353.

[12] KANG U, CHANG C S, KIM Y S. Genetic structure and conservation considerations of rare endemic *Abeliophyllum distichum* Nakai (Oleaceae) in Korea [J]. Journal of Plant Research, 2000,113: 127-138.

[13] HELENURM K. High level of genetic polymorphism in the insular endemic herb [J]. Jepsonia malvifolia. Journal of Heredity, 2001,97: 427-432.

[14] ZAWKO G, KRAUSS SL, DIAON KW, et al.. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae) [J]. Molecular Ecology, 2001,10: 2389-2396.

[15] XIAO L Q, GE X J, GONG X, et al.. ISSR variation in the endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae)[J]. Annals of Botany, 2004,94: 1-6.

[16] WANG X Q, ZOU Y P, ZHANG D M, et al.. Genetic diversity analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang[J]. Science in China,1997,40: 91-97.