

叶绿体微卫星分析濒危植物资源冷杉的遗传多样性* Study on Genetic Diversity of the Endangered Plant *Abies ziyuanensis* by Using Chloroplast SSR Marker

代文娟¹,唐绍清^{1**},刘燕华²

DAI Wen-juan¹,TANG Shao-qing^{1**},LIU Yan-hua²

(1. 广西师范大学生命科学学院,广西桂林 541004;2. 广西师范大学附属中学,广西桂林 541004)

(1. The College of Life Science,Guangxi Normal University,Guilin,Guangxi,541004,China;2. The High School Affiliated to Guangxi Normal University,Guilin,Guangxi,541004,China)

摘要:用叶绿体微卫星(cpSSR)分子标记研究资源冷杉(*Abies ziyuanensis*)的遗传变异。资源冷杉分别取样于广西资源县和湖南城步县交界的银竹老山、湖南东安和新宁交界处的舜黄山、湖南炎陵县大院的7个居群。样品采用CTAB法进行总DNA的提取,用6对cpSSR引物进行扩增,扩增产物经95℃变性后在6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,然后应用POPGEN Version 1.31软件计算资源冷杉各个居群的Nei's基因多样性指数(*He*),Shannon信息多样性指数(*I*),基因分化系数(*Gst*)以及Nei's遗传距离。用NTSYSpc Version 2.10软件进行UPGMA聚类分析,并对地理距离和遗传距离相关性进行Mantel检验。用ARLEQUIN2.000软件分析地区间、居群间和居群内的遗传变异,统计有效单型模式数量。结果6对cpSSR引物中选出3对多态性引物,共扩增出7个位点。Nei's基因多样性 He 为0.2922,信息多样性指数 I 为0.4428,基因分化系数 Gst 为0.5805。资源冷杉的遗传分化主要存在于居群间,分布在银竹老山和舜黄山的资源冷杉与分布在大院的资源冷杉之间产生了明显的遗传分化,两地资源冷杉之间的遗传变异占总的68.87%。

关键词:资源冷杉 遗传变异 叶绿体SSR

中图分类号:Q16 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2006)02-0151-05

Abstract: The genetic variation of *Abies ziyuanensis* was studied by using chloroplast simple-sequence repeats (cpSSR) markers. The individuals of seven populations of *A. ziyuanensis* were sampled from Yinzhulaoshan of Guangxi, Shunhuangshan of Hunan and Dayuan of Hunan. Total genomic DNA was extracted using CTAB protocol. The amplification reaction was performed with six pair primers, and the fragments were denaturalized with 95℃ before being loaded and run on a 6% denaturing polyacrylamide gel. The Nei's gene diversity (He), Shannon information index (I), the coefficient gene differentiation (Gst) and Nei's genetic distance were computed by POPGEN Versin 1.31. UPGMA dendrogram was constructed by NTSYSpc Version 2.10. The correlations between genetic distance and geographical distance were investigated using a Mantel test. Analysis of molecular variance was conducted to calculate variance components for variation between two regions, among populations, and within populations using ARLEQUIN version 2.000. Haplotypes were analyzed using this software. Seven loci were amplified by three pair primers screened from six pair primers. Nei's gene diversity (He) was 0.2922, Shannon information index (I) was 0.4428 and the coefficient gene differentiation (Gst) was 0.5805. Genetic variation of *Abies ziyuanensis* were mainly existed among populations. High level of genetic differentiation was detected between the populations in Yinzhulaoshan and Shunhuangshan and in Dayuan, and the genetic variation between the two regions totally accounted for 68.87%.

Key words: *Abies ziyuanensis*, genetic variation, cpSSR

收稿日期:2005-09-06

修回日期:2005-11-15

作者简介:代文娟(1981-),女,贵州黔西县人,硕士研究生,主要从事植物保护生物学研究。

* 国家自然科学基金(30260013)资助项目。

** 通讯作者。

资源冷杉(*Abies ziyuanensis*)是松科冷杉属植物,被列于《中国植物红皮书》中^[1],在1998年ICUN拟订的“针叶树行动计划”中被列为全球重点保护的针叶树种,是国家一级保护植物^[2]。资源冷杉分布于

广西与湖南交界的银竹老山,湖南舜黄山,湖南炎陵县大院林场及江西井冈山^[3~5]。据文献记载,大院林场曾有超过 1000 株的资源冷杉^[6],银竹老山的数目在百株以上,湖南舜黄山的数量较少^[3],井冈山的数量则只有 4 株^[5]。但是,现在的调查与记载有较大差异,资源冷杉总共不到 600 株,其中,大院林场的资源冷杉数目在 450 株左右,银竹老山不足 50 株,舜黄山约 20 株^[7]。其分布呈斑点状或小块状,地域狭窄,数量少,已成高度濒危状态^[2]。

对资源冷杉在木材解剖^[8]、地理成因^[2]、种群保育^[7]等方面的研究已有报道。苏何玲等^[9]应用 RAPD 分子标记分析了资源冷杉的遗传多样性。叶绿体微卫星(cpSSR)是近年发展起来的一种新型分子标记。cpSSR 能显示高水平的种内多样性,可以用这一特性来了解进化群体生物学、群体迁移模式、群体历史和群体分化水平^[10],此外,还可以用于群体间单型模式的变异分布,有助于对物种进化历史的理解并据此制定出群体保存策略^[11]。由于 cpSSR 兼具 SSR 及叶绿体 DNA 的优点,近年来被应用于多种植物居群^[12,13],包括冷杉属^[14,15]的遗传分析及系统发育分析研究中。本研究以资源冷杉 7 个居群为对象,用 cpSSR 标记对其进行遗传变异研究。

1 材料和方法

1.1 材料

根据资源冷杉的地理分布情况,分别在广西资源县和湖南城步县交界的银竹老山、湖南东安和新宁交界处的舜黄山、湖南炎陵县大院林场取样。共取了 7 个居群,各居群的代号、地理位置及取样个体数见表 1。居群内个体间取样间隔尽可能远。采集资源冷杉的枝叶,插入水中迅速带回实验室。将新鲜叶子洗净风干后装入封口袋中于 -70℃ 保存备用。

1.2 DNA 提取

采用 CTAB 法^[16]进行总 DNA 提取,提取前在水浴前用丙酮洗 2 次。

1.3 引物选取及 PCR 反应条件及检测

参考文献^[17]用 6 对 cpSSR 引物进行扩增,引物由上海生工合成,引物序列见表 2。

PCR 在 UNOII Thermoblock 上进行,反应体系参照文献^[18],并对 Mg²⁺ 浓度作适当调整。每个 cpSSR 反应为每管 25μl,其中包括 1×PCR buffer, 0.2μmol/L dNTPs, 1.5μmol/L Mg²⁺, 0.2μmol/L 引物, 1U Taq 酶(大连, TaKaRa), 25~50ng 的模板 DNA。PCR 扩增程序:95℃ 预变性 5min,加 Taq 酶 85℃ 反应 5min,接着进行 25 个循环:94℃ 变性 1min,

55℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,循环结束后 72℃ 延伸 8min。

表 1 7 个取样居群的代码、地理位置、海拔及采样数

Table 1 Location, altitude and sample size (number of individuals) of seven *Abies ziyuanensis* populations

居群 Population	地理位置 Location	海拔高度 Altitude (m)	采样数 Sample size (个)
DA	湖南东安和新宁交界舜黄山 Shunhuangshan, DongAn and Xinning, Hunan N 26°22.414', E 111°00.553'	1701	19
YS	广西资源银竹老山圣堡塘 Shengbaotang, Yinzhulaoshan, Ziyuan, Guangxi N 26°15.292', E 110°33.295'	1811	20
YH	广西资源银竹老山三角湖塘 Sanjiaohutang, Yinzhulaoshan, Ziyuan, Guangxi N 26°15.929', E 110°33.294'	1781	15
DM	湖南炎陵大院林场绵阳龙 Mianyanglong, Dayuan, Yanling, Hunan N 26°24.470', E 114°01.756'	1470	21
DZ	湖南炎陵大院林场中牛石 Zhongniushi, Dayuan, Yanling, Hunan N 26°25.858', E 114°02.768'	1470	21
DX	湖南炎陵大院林场香菇棚 Xianggupeng, Dayuan, Yanling, Hunan N 26°26.221', E 114°03.139'	1470	22
DJ	湖南炎陵大院林场鸡麻捷 Jimajie, Dayuan, Yanling, Hunan N 26°26.328', E 114°04.017'	1470	21

表 2 cpSSR 引物号及序列

Table 2 Primer code and sequence of cpSSR

引物号 Primer code	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	位点数 No. of loci
Pt63718	CAC AAA AGG ATT TTT TTT CAG TG CGA CGT GAG TAA GAA TGG TTG	6
Pt30204	TCA TAG CGG AA GAT CCT CTT T CGG ATT GAT CCT AAC CAT ACC	6
Pt71936	TTC ATT GGA AAT ACA CTA GCC C AAA ACC GTA CAT GAG ATT CCC	7
Pt109567	TAT TAT CGA ACA ACG AGA ATA ATC C TCA CTG TCA CTC TAC AAA ACC G	2
Pt15169	CTT GGA TGG AAT AGC AGC C GGA AGG GCA TTA AGG TCA TTA	1
Pt110048	TAA GGG GAC TAG AGC AGG CTA TTC GAT ATT GAA CCT TGG ACA	2

扩增产物经 95℃ 变性后在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上,于 75W 恒功率电泳 1.5h,电泳后用银染的方法进行染色,银染参照许绍斌等^[19]的方法并做适当改进,即将胶剥离后,加入已经加热至 55℃ 的染色液(0.6g AgNO₃, 600ml 蒸馏水),摇床轻摇 10min;自来水漂洗 2 次;然后加入加热至 55℃ 的显色液

(0.24g 无水碳酸钠, 0.35g 碳酸氢钠, 12g 氢氧化钠, 2.4ml 甲醛), 轻摇 2~3min 至条带清晰, 然后漂洗 1 次, 用扫描仪进行图像保存。

1.4 数据统计与分析

在电泳图谱中同一位置的条带视为一个位点, 按凝胶上同一位置上条带的有无进行统计, 有带的记为 1, 无带的记为 0。应用 POPGEN Version 1.31 软件 (Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada) 计算资源冷杉各个居群的等位基因观察数 ($A = \sum A_i/n$, A_i 代表第 i 个位点上的等位基因数, n 代表所测定的位点的总数), 有效等位基因数 ($A_e = \sum (1/\sum q_i^2)/n$, q_i 代表第 i 个基因的频率, n 为所测定的位点的总数), 等位基因频率, Nei's 基因多样性指数 ($He = \sum (1 - \sum q_i^2)/n$, q_i 代表第 i 种纯合基因型的频率, n 代表所测定的位点总数)^[20], Shannon 信息多样性指数 (I), 多态位点百分数 (PPL), 基因分化系数 (Gst) 以及 Nei's 遗传距离^[21]。用 NTSYSpc Version 2.10 (Setauket, New York, USA), 根据居群间的 Nei's 遗传距离^[21], 对资源冷杉居群进行 UPGMA 聚类分析, 并对地理距离和遗传距离相关性进行 Mantel 检验^[22]。用 ARLEQUIN2.000 软件 (Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva) 分析地区间, 居群间和居群内的遗传变异, 统计有效单型模式数量 ($ne = 1/\sum P_i^2$, P_i 代表第 i 种单倍型的频率)^[23,24]。

2 结果与分析

2.1 资源冷杉的遗传多样性

6 对叶绿体 SSR 引物中的 3 对 (pt63718, pt30204, pt71936) 扩增得到的位点有多态性, 这 3 对引物在 139 个样品中共扩增出 7 个位点, pt63718 扩增出 2 个位点, pt30204 扩增出 2 个位点, pt71936 扩增出 3 个位点。7 个位点均为多态位点。组合成 18 种不同的单倍型。居群的多态位点百分率为 0~

85.71%, 较高的是舜黄山居群 (DA) 和银竹老山三角湖塘居群 (YH) (均为 85.71%), 无多态性的是香菇棚居群 (DX) 和鸡麻捷居群 (DJ), 详见表 3。

在种的水平上, 资源冷杉的 Nei's 基因多样性指数为 0.2922, Shannon's 信息多样性指数为 0.4428 (表 3)。居群 Nei's 的基因多样性指数在 0~0.3254 之间, 最高的是舜黄山居群 (DA) (0.3254), 最低的是香菇棚居群 (DX) 和鸡麻捷居群 (DJ) (0.000); Shannon's 信息多样性指数在 0~0.4835 之间, 最高的是舜黄山居群 (0.4835), 最低的是香菇棚居群和鸡麻捷居群 (0.0000) (表 3)。居群的等位基因观察数 (A) 平均值为 1.4286, 有效等位基因数 (A_e) 为 1.2096 (表 4)。各个位点的等位基因频率见表 5。

2.2 资源冷杉的遗传分化

AMOVA 分析结果 (表 6) 表明, 两两居群间的遗传分化 (Φ_{st}) 在 0.0000~0.9172 之间, 平均值为 0.4876。银竹老山 (YS) 和大院香菇棚居群 (DX) 的遗传分化程度最高 ($\Phi_{st} = 0.9172$, $P < 0.001$); 而大院中牛石居群 (DZ) 和鸡麻捷居群 (DE), 香菇棚居群 (DX) 和鸡麻捷居群 (DJ) 的叶绿体 SSR 没有差异 ($\Phi_{st} = 0.0000$, $P < 0.001$)。对资源冷杉居群的地理距离和遗传距离进行了 Mantel 检验的结果表明, 地理距离和遗传距离呈显著性相关 ($r = 0.8848$, $P = 0.001$)。

POPGEN 软件分析表明, 7 个居群总的基因多样性为 0.3060, 其中居群内的基因多样性为 0.1283, 居群间的基因多样性为 0.1777。基因分化系数为 0.5805, 居群间的遗传变异占总的遗传变异的 58.05%, 说明遗传变异主要存在于居群间。居群间基因流 (Nm) 为 0.3613, Nm 小于 1, 说明居群间基因交流有限。将分布在银竹老山和舜黄山的 3 个资源冷杉居群作为一组, 分布在大院的 4 个居群作为一组, 进行 AMOVA 分析, 组间的遗传变异占总遗传变异的 68.87%, 组内居群间的遗传变异占 6.88%, 居群内的遗传变异占 24.25%。

表 3 资源冷杉 7 个居群的遗传变异

Table 3 Genetic variation of the seven populations of *Abies ziyuanensis*

居群 Population	总位点数 Total no. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	PPL (%)	He	I
DA	6	6	85.71	0.3254(0.1655)	0.4835(0.2321)
YS	6	4	57.14	0.0966(0.1544)	0.1638(0.2226)
YH	7	6	85.71	0.2591(0.1695)	0.4033(0.2323)
DM	5	4	57.14	0.2099(0.2082)	0.3146(0.3039)
DZ	4	1	14.29	0.0067(0.0178)	0.0162(0.0429)
DX	3	0	0.00	0.0000(0.0000)	0.0000(0.0000)
DJ	3	0	0.00	0.0000(0.0000)	0.0000(0.0000)
总计 Total	7	7	100	0.2922(0.1962)	0.4428(0.2484)

括号中数值为标准差 Standard deviations in parenthesis.

表 4 资源冷杉 7 个居群间的等位基因观察数 A , 有效等位基因数 (A_e) 和单型模式的种类

Table 4 Observed number of alleles (A), Effective number of alleles (A_e) and Effective number of haplotypes among the seven populations of *Abies ziyuanensis*

居群 Population	等位基因 观察数 A Observed number of alleles A	有效等位 基因数 A_e Effective number of alleles A_e	单型模式 的种类 Effective number of haplotypes
DA	1.8571	1.5489	8
YS	1.5714	1.1471	4
YH	1.8571	1.4145	7
DM	1.5714	1.3497	4
DZ	1.1429	1.0071	2
DX	1.0000	1.0000	1
DJ	1.0000	1.0000	1
平均值 Average	1.4286	1.2096	2.5

表 6 资源冷杉 7 个居群间的地理位置 (km, 对角线上方) 和遗传分化 (Φ_{st} , 对角线下方)

Table 6 Geographic distance (km, above diagonal) and Nei's genetic differentiation (Φ_{st} , below diagonal) among the seven populations of *Abies ziyuanensis*

居群 Population	DA	YS	YH	DM	DZ	DX	DJ
DA	0.0000	47.2	46.8	300.8	302.5	303.1	304.6
YS	0.2311***	0.0000	1.2	346.6	348.4	349.1	350.5
YH	0.1150***	0.2785***	0.0000	346.5	348.3	349.0	350.4
DM	0.3937***	0.6322***	0.5336***	0.0000	3.1	3.9	5.1
DZ	0.6513***	0.9016***	0.8070***	0.2688***	0.0000	0.9	2.2
DX	0.6720***	0.9172***	0.8267***	0.3063***	0.0023***	0.0000	1.4
DJ	0.6660***	0.9152***	0.8244***	0.3000***	0.0000***	0.0000***	0.0000

*** $P < 0.001$.

2.3 聚类分析

UPGMA 聚类分析结果 (图 1) 表明, 资源的两个居群和舜黄山居群聚成一支, 大院的 4 个居群聚成一支, 两分布地彼此明显地区分开来。这进一步表明资源冷杉居群间和分布地产生了较大的遗传分化。

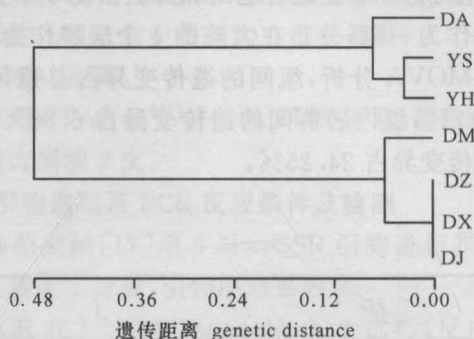


图 1 基于 Nei's 遗传距离构建的资源冷杉 7 个居群 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of seven populations of *Abies ziyuanensis* based on Nei's unbiased measures of genetic distance

表 5 资源冷杉 7 个位点的等位基因频率

Table 5 Frequency of alleles of the seven loci of *Abies ziyuanensis*

等位基因 Allele	等位基因频率 Frequency of alleles	
	等位基因 1 Alleles 1	等位基因 2 Alleles 2
pt63718-a	0.9658	0.0342
pt63718-b	0.0314	0.9686
pt30204-a	0.4037	0.5963
pt30204-b	0.7519	0.2481
pt7193-a	0.9263	0.0737
pt7193-b	0.6652	0.3348
pt71936-c	0.4064	0.5936

3 讨论

叶绿体 SSR 作为一种新型分子标记, 在植物群体遗传结构分析和系统演化分析中潜能较大^[12]。本研究中扩增得到的 cpSSR 带型清晰, 遗传分化系数平均值为 0.4876, 说明 cpSSR 分子标记是适合研究资源冷杉遗传变异的方法。

资源冷杉的叶绿体 SSR 分析结果表明, 资源冷杉居群遗传变异主要存在于居群间 ($G_{st} = 0.5805$), 分布在银竹老山和舜黄山的资源冷杉与分布在大院的资源冷杉之间产生了明显的遗传分化, 两地资源冷杉之间的遗传变异占总的 68.87%。聚类分析结果表明, 分布在东安、资源的居群与大院的 4 个居群各聚成一支。这与 RAPD 的分析结果^[9]相似。冷杉植物的生长对温度有着严格的要求, 第四纪冰期的气候变化尤其是末次盛冰期对世界现代冷杉属植物的分布格局的形成起着决定的作用。冰期过后, 形成了我国资源冷杉孤立、残遗分布于各局部地区高海拔地段的现代分布式样^[2]。呈孤岛状分布的资源冷杉居群, 其

两间断分布地(银竹老山和舜黄山,大院)的地理距离在 300km 以上,较长时间的地理隔离阻碍了它们之间的基因交流。居群间的基因流较低 ($Nm = 0.3613$)。而 $Nm < 1$, 则遗传漂变可以导致居群间明显的遗传分化^[25]。

目前分布有的资源冷杉总共不到 600 株^[7],其分布呈斑点状或小块状,地域狭窄,数量少,其灭绝的可能性极大,已成高度濒危状态。根据现在研究结果,分布在银竹老山和舜黄山的资源冷杉与分布在大院的资源冷杉之间产生了较明显的遗传分化,在开展保护工作时同时要同时重视两分布地的保护工作。

致谢

本研究在采样时得到湖南东安县舜黄山公园管理局和资源县银竹老山自然保护区的大力协助,在此表示衷心感谢!

参考文献:

[1] 罗仲春,陈湘健.资源冷杉[M]//傅立国.中国植物红皮书:第一册.北京:科学出版社,1992:62-63.

[2] 向巧萍.中国的几种珍稀濒危冷杉属植物及其地理分布成因的探讨[J].广西植物,2001,21(2):113-117.

[3] 傅立国,吕庸浚,莫新礼.冷杉属植物在广西和湖南首次发现[J].植物分类学报,1980,18(2):205-210.

[4] 刘起銜.湖南产新植物[J].植物研究,1988,8(3):85-86.

[5] 汪维勇,裘利洪.江西裸子植物多样性及保护[J].江西林业科技,1998(S1):13-15.

[6] 肖学菊,康华魁.关于大院冷杉的考查报告[J].植物新探,1991(3):38-40.

[7] 张玉荣,罗菊春,桂小杰.濒危植物资源冷杉的种群保育研究[J].湖南林业科技,2004,31(6):26-29.

[8] 吉成均,方精云,谢长富.我国南部 5 种冷杉植物木材的比较解剖学研究[J].西北植物学报,2003,23(7):1202-1208.

[9] 苏何玲,唐绍清.濒危植物资源冷杉遗传多样性研究[J].广西植物,2004,24(5):414-417.

[10] PROVAN J,POWELL W,HOLLINGSWORT P M. Chloroplast microsatellites:new tools for studies in plant ecology and evolution [J]. Trends in Ecology and Evolution,2001,16(3):142-147.

[11] 陈伯望,汪菊生,施行博.杉木和秃杉群体的叶绿体微卫星分析[J].林业科学,2000,36(3):46-51.

[12] 张新叶,白石进,黄敏仁.日本落叶松群体的叶绿体 SSR 分析[J].遗传,2004,26(4):486-490.

[13] 程运江,郭文武,邓秀新.叶绿体 SSR 标记:柑桔体细胞杂种胞质遗传分析的一种新方法[J].植物学报,2003,45(8):906-909.

[14] VENDRAMIN G G,DEGEN B,PETIT R J,et al. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe [J]. Molecular Ecology, 1999, 8: 1117-1126.

[15] PARDUCCI L,SZMIDT A E,MADAGHIELE A,et al. Genetic variation at microsatellites (cpSSR) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species [J]. Theoretical Applied Genetics, 2001, 102: 733-740.

[16] DOYLE J J,DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemical Bulletin, 1987,19:11-15.

[17] VENDRAMIN G G,LELLI L,ROSSI P,et al. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae [J]. Molecular Ecology, 1996,5:595-598.

[18] VENDRAMIN G G,ZIEGENHAGEN B. Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies* [J]. Genome,1997,40:857-864.

[19] 许绍斌,陶玉芬,杨昭庆,等.简单快速的 DNA 银染和胶保存方法[J].遗传,2002,24(3):335-336.

[20] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. [J] Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1973, 70: 3321-3323.

[21] NEI M. Genetic distance between population [J]. American Naturalist, 1972, 106: 283-292.

[22] MENTAL N A. The detection of disease clustering and generalized regression approach [J]. Cancer Research, 1967, 27: 209-220.

[23] NEI M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.

[24] AVISE J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. New York: Chapman and Hall, 1994.

[25] WRIGHT S. The genetical structure of populations [J]. Annals of Eugenics, 1951, 15: 323-354.

(责任编辑:邓大玉)