

三个不同海拔梯度马尾松种群的遗传多样性及其与生态因子的相关性

李 丹, 彭少麟*

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要:采用 RAPD 技术分析测定了 3 个马尾松海拔梯度种群的分子遗传特征。马尾松种群中遗传多样性较高, AMOVA 软件分析 Euclidean 系数 SSD 总和达 8164.116; L1、L2、L3 三个种群的遗传多样性分别为 7.4832、7.4011、7.0332; 种群间的分化程度较低, 大部分变异存在于种群内(约 $\geq 97\%$), 种群间仅占一小部分(约 $\leq 2\%$); 相关性分析表明种群的遗传多样性与土壤的总氮量呈显著负相关性($P < 0.05$), 而与其它生态因子相关关系不显著; 虽然种群间遗传距离值均很低(L1~L2、L2~L3、L1~L3 分别为 -0.0002 、 0.0001 、 0.0051), 但其值与海拔差距呈显著正相关性。

关键词: RAPD 技术; 马尾松; 遗传多样性; 生态因子

Genetic diversity in three *Pinus massoniana* populations in different elevations and its relationship with ecological factors

LI Dan, PENG Shao-Lin (South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510650, China)

Abstract: High genetic diversity was found in these populations, and the sum of SSD was 8164. Genetic diversity in three *Pinus massoniana* populations of different elevation was determined by means of RAPD and they were 7.48, 7.40, 7.03. The differentiation level among populations was low. Less than 2% of genetic diversity was attributed to the differentiation among the populations while more than 97% resided within the different populations. Correlation analysis shows a significant relation between genetic diversity and total nitrogen ($P < 0.05$), and no significant relation was observed between genetic diversity and other ecological factors. Though the genetic distance among the populations was very small, there was a significant relation between it and the distance of elevation.

Key words: RAPD; *Pinus massoniana*; genetic diversity; ecological factors

文章编号: 1000-0933(2001)03-0415-07 中图分类号: Q789 文献标识码: A

在我国, 马尾松(*Pinus massoniana*)被用作绿化造林和荒山废地恢复植被的主要先锋树种, 同时又是许多林产工业的重要原材料。因此, 无论是在发挥生态效应还是在创造经济价值方面, 马尾松都占据着举足轻重的地位。长期以来, 人们对马尾松的研究集中于其复杂的种群动态和丰富的遗传变异两个方面, 到目前为止, 这两方面的工作都取得了一定的成果^[1~13]。然而, 生物的各项生态学特征都是生物本身的遗传物质——DNA 在特定的生态环境中与其它各种生物的、非生物的环境因子相互作用的结果, 是生物基因组与复杂的生态环境相互作用的综合表现。因此, 面对极其复杂的生态学问题, 要更加全面和深入地了解生

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(编号: 39899370), 广东省自然科学基金重大项目(编号: 980952), 中国科学院重大项目(编号: KZ951-B1-110), 中国科学院鹤山丘陵综合试验站开放研究基金资助

* 通讯联系人

收稿日期: 1999-11-01; 修订日期: 2000-04-10

作者简介: 李丹(1971—), 女, 回族, 广西人, 博士。主要从事分子生态学研究工作。

生态学现象,从本质上阐明马尾松各项生态学特征及其种群时空上的动态规律,则必须将这两个方面的研究成果结合起来,即将传统的宏观生态学与新兴的分子生物学结合起来,将生物基因组/库本身也作为一个对生态系统有着重要作用的主导因子,考虑到生态学研究中去^[14~16]。这也就是国际上新兴的由传统生态学和分子生物学交叉形成的分子生态学^[17~19]。

本文从分子生物学入手,以 RAPD 技术为方法,了解不同海拔高度的马尾松种群的 DNA 水平的遗传多样性特征;并与其相应的宏观生态学特征相联系,试图进一步找到生物基因组水平的变异特征与生物种群时空动态之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1994 年 4 月于广东省罗壳山不同海拔高度分别选取含有马尾松组分的植物群落共 3 个样地 L1 (200m)、L2(520m)、L3(830m),组成海拔梯度组。在各样地中的马尾松种群中,间隔约 5m 分别随机选取胸径 ≥ 5 cm、生长良好的 10 株优势马尾松植株,采取其当年萌发的嫩叶,并立即至于 -70°C 液氮中携至实验室,于 -30°C 冰箱内保存,供提取 DNA。

1.2 DNA 的提取与扩增

本实验室在研究马尾松分子生态学特征的实际工作中选取了能够获得质量较高的基因组 DNA,而且耗时、耗费较少的 CTAB 沉淀法。将马尾松针叶剪碎后,加液氮研磨成细粉状。称取 100mg 粉末于 1.5ml 离心管中。加入 0.5ml CTAB 提取液(100mM Tris-HCl, pH8.0; 1.4M NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB(W/V); 1% PVP(W/V); 0.4% 巯基乙醇),充分混匀后,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30min,冷却至室温,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),充分混匀后 12 000 rpm 离心 10min,重复抽提 2 次后,取上清,加入 4 倍体积的 CTAB Precipitation buffer(100mM Tris-HCl, pH8.6; 10mM EDTA; 1% CTAB(W/A)),混匀后在室温下静置 5min~1h 后,12 000 rpm 离心 5min,将所得沉淀溶于 400 μl 1M NaCl 溶液中,加入 2.5 体积的 -20°C 无水乙醇,12 000 rpm 离心 5min,将所得沉淀用 70%乙醇洗涤 2 次,风干后溶于 100 μl TE(10mM Tris-HCl, pH8.0; 1mM EDTA)。加入 5 μl RNaseA(10mg/ml),37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1h,再用乙醇沉淀,将所得的 DNA 最终溶于 100 μl TE 中。将所得 DNA 样品稀释为 10 ng/ μl ,作为模板进行 RAPD 反应。

PCR 扩增反应在 Biometra UNO-Thermoblock PCR 仪上执行。反映体系(20 μl)组成如下:20ng 模板 DNA,引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$,dNTP 0.25 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 4mmol/L,Tag 酶 1U。扩增反应循环条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20'',40 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10'',72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1',反应 2 个循环后,接着进行 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1'',40 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10'',72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1',反应 43 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10'。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色后,照相记录。

实验所用 RAPD 扩增引物购自 Sangon 公司,均为 10 碱基引物。

1.3 引物筛选

随机选择 2 个 DNA 样品用于筛选有扩增产物的引物,然后两次分别用随机挑选的 4 个 DNA 样品对有产物的引物进行二次筛选,确定扩增效果好、重复性高及多态性明显的引物作为正式 RAPD 引物。

1.4 各种群生态特征的测定

罗壳山位于广东省广宁县境内,北纬 23 $^{\circ}55'$,东经 112 $^{\circ}60'$ 。罗壳山气候为南亚热带季风气候,具有气候温暖、雨量充沛的特点。其地质构造以泥盆纪花岗岩为主,地形起伏大,属山地地貌,海拔高度约为 100~1339m。土壤主要为赤红壤,约 750m 以上则为黄壤,主要由花岗岩、砂页岩、砂岩等发育而成。植被覆盖较好,腐殖质丰厚。马尾松主要分布于海拔 100~850m 的山地中,900m 以上则极少见^[20]。3 个马尾松种群的若干生态特征内容见表 1。

1.5 数据处理

1.5.1 RAPD 多样性表型带计数 RAPD 扩增结果经电泳、染色和照相后,针对每一条为 RAPD 遗传标记的谱带,若存在,则赋值为“1”,若不存在,则赋值为“0”;若为强带,则赋值为“1”,若为弱带,则赋值为“0”,记录后备用万方数据

1.5.2 马尾松种群遗传结构特征的分析 分别采用 Shannon 信息指数和 RAPDistance(Version 1.04 for

the analysis of patterns of RAPD)及 AMOVA(Analysis of molecular variation)软件计算马尾松种群内的遗传多样性和马尾松种群间的遗传距离^[18,19]。

1.5.3 马尾松种群遗传结构特征与生态因子的相关性的测定 采用 Microsoft Excel 分别对马尾松种群内遗传多样性与生态因子及种群间遗传距离与海拔差距进行相关性分析。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

经过 2 次筛选,最终由约 100 条随机引物中选出 8 条引物共产生 100 条扩增带,其中 71 条带具多态性,占扩增产物总数的 71%。用这 8 条引物对 30 个样品进行 PCR 反应,产生 RAPD 标记(图 1)。为便于不同研究者之间比较,现将这 8 种引物的碱基序列及其对马尾松种群针叶 DNA 扩增反应后所得的 RAPD 遗传标记的谱带模式分别列于表 2 与图 2。

表 1 3 个马尾松种群的生态特征变量

Table 1 Ecological variables in three *Pinus massoniana* populations

生态因子变量 Ecological variables	L1	L2	L3
海拔高度 Altitude(m)	200	520	830
坡向 Aspect	DN20°	E	EN10°
坡度 Slope	40°	40°	30°
pH 值 pH value	4.7	5.4	5.3
总氮 Total nitrogen(%)	0.102	0.153	0.329
总磷 Total phosphorus(P ₂ O ₅ %)	0.047	0.053	0.046
马尾松种群多度 (Number in population/100m ²)	12.0	4.8	1.5
群落类型 Community type	马尾松林 <i>Pinus massoniana</i> forest	针阔叶混交林 Pine and broad-leaved forest	常绿阔叶林 Evergreen broad-leaved forest
种群分布格局 Population pattern	集群分布 Contagious distribution	趋于随机分布 Tend to random distribution	随机分布 Random distribution

2.1.1 马尾松种群内遗传多样性 L1、L2、L3 三个马尾松种群的遗传多样性见表 3。其结果表明,L1 种群内的遗传多样性较高,L2 略小于 L1,而 L3 最小。3 个种群的平均遗传多样性(H_{pop}^*)为 7.3058,种群总的遗传多样性(H_{sp})为 7.4610, H_{pop}^*/H_{sp} 为 0.9792, $(H_{sp}-H_{pop}^*)/H_{sp}$ 为 0.02089(即 97.92%的遗传多样性存在于种群内,种群间的分化仅占 2.08%)(表 3a);且马尾松种群 SSD 总和达 8164.116,但变异的 99.17%都在种群内,而且 Φ_{st} 仅为 0.008(表 3b)。这些特征值都反映出,尽管马尾松种群内的遗传多样性很高,但种群间的分化程度较低,大部分变异存在于种群内,种群间仅占一小部分。

2.1.2 马尾松种群间遗传距离 L1、L2 三个马尾松种群的遗传距离见表 4。由于 L1、L2、L3 三个马尾松种群间遗传距离均很低,甚至为负值,说明种群间分化不明显。

2.2 马尾松种群遗传结构与生态因子的相关性

2.3.1 种群内遗传多样性与生态因子的相关性的测定 马尾松种群内的遗传多样性与各生态因子变量的相关系数见表 5。其中,仅有土壤的总氮量与种群的遗传多样性呈显著负相关性($P < 0.05$),而与其它生态因子相关关系不显著($P > 0.05$)。说明土壤总氮量越高,种群遗传多样性越低。

2.3.2 种群间遗传距离与海拔差距的相关性的测定 3 个马尾松种群两两之间的遗传距离与海拔差距的相关系数见表 6。说明马尾松种群间遗传距离与海拔差距呈显著正相关性($P < 0.05$)。说明种群间海拔差距越大,其遗传距离越大。

3 讨论 万方数据

本文作为探讨植物种群基因组水平的变异与种群空间动态之间的关系的一种初步尝试,以 RAPD 技

术为手段,对 3 个马尾松海拔梯度种群的遗传多样性进行了研究与分析,并运用数学统计方法进一步探讨了马尾松种群遗传多样性特征指数与种群所处的特殊生态环境的各因子这之间的相关性。根据上述研究结果,初步得到以下三点结论:

表 2 8 种引物对 3 个马尾松种群共 30 株马尾松针叶 DNA 进行扩增反应结果
Table 2 Result of RAPD on leaves of 30 *Pinus massoniana* in 3 populations with 8 primers

引物 Primer	序列 Sequence	G+C 含量 G+C number	扩增带数 Amplified bands	杂和带数 Heterozygous bands
S191	AGTCGGGTGG	7	19	10
S198	CTGGCGAACT	6	10	8
S226	AGGCCCAGGT	7	25	14
S237	ACCGGCTTGT	6	9	8
S238	TGGTGGCCTT	6	9	8
S446	CCACGGGAAG	7	10	9
S447	CAGCACTGAC	6	10	8
S461	GTAGCACTCC	6	8	6
		\sum	100	71
		(%)	100	71

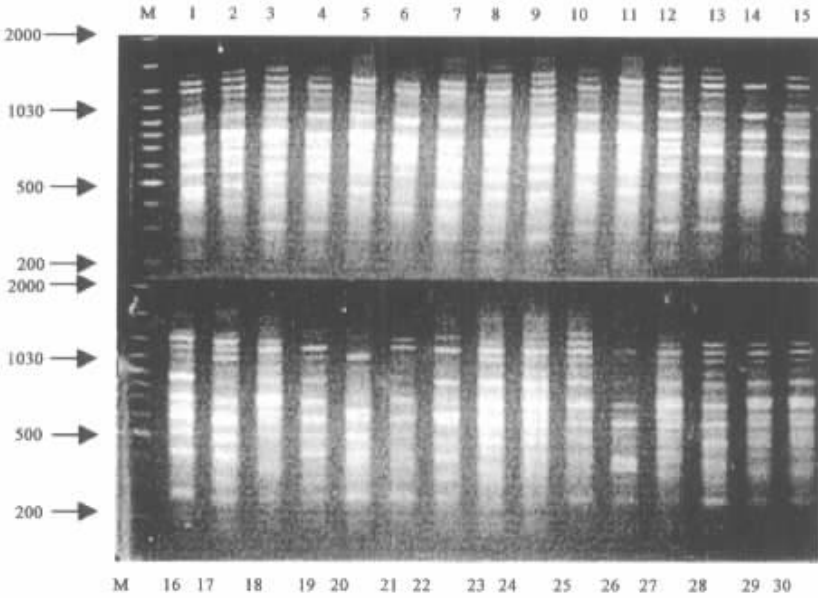


图 1 引物 S191 的 RAPD 片段

Fig. 1 Segregation of RAPD bands amplified with primer S191

M: 分子量标记; 1~10: L1 马尾松种群 10 株个体针叶 DNA 扩增产物; 11~20: L2 马尾松种群 10 株个体针叶 DNA 扩增产物; 21~30: L3 马尾松种群 10 株个体针叶 DNA 扩增产物

M: Molecular weight marker; 1~10: Amplified bands from leaves of 10 *P. massoniana* in L1 population; 11~20: Amplified bands from leaves of 10 *P. massoniana* in L2 population; 21~30: Amplified bands from leaves of 10 *P. massoniana* in L3 population

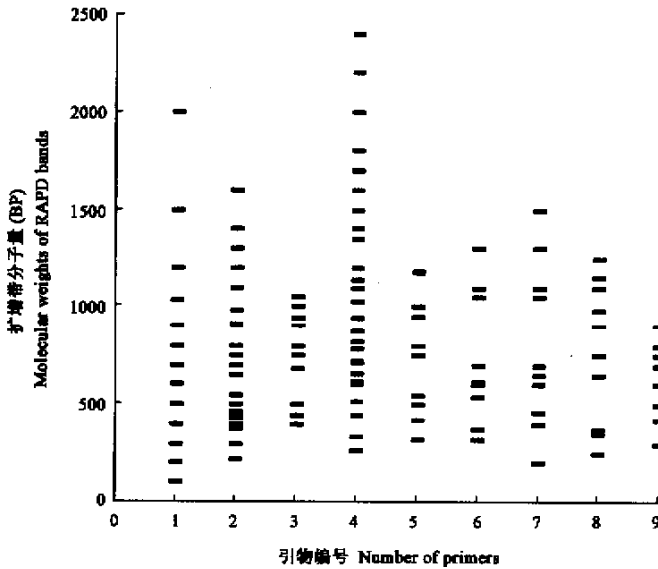


图 2 8 种引物对 3 个马尾松种群共 30 株马尾松针叶 DNA 进行 RAPD 分析筛选获得的 100 条稳定扩增带
Fig. 2 100 steady bands screened out from RAPD on leaves of 30 *P. massoniana* in 3 populations with 8 primers
1; 引物 Marker; 2; S191; 3; S198; 4; S226; 5; S237; 7; S446; 8; S447; 9; S461

(1) 马尾松种群具有丰富的遗传多样性,但种群间的分化程度较低,大部分变异存在于种群内(约 ≥ 97%),种群间仅占一小部分(约 ≤ 2%)。分析其原因主要是由于马尾松分布范围广,区内气候、土壤等条件

表 3 三个马尾松种群内的遗传多样性特征

(a; Shannon 多样性信息指数; b; Euclidean 系数)

Table 3 Genetic diversity within three *Pinus massoniana* populations (a; Shannon diversity information index; b; Euclidean quotiety)

种群 Population	L1	L2	L3
H_{pop}	7.4832	7.4011	7.0332
H_{pop}^*		7.3058	
H_{sp}		7.4610	
H_{pop}^*/H_{sp}		0.9792	
$(H_{sp} - H_{pop}^*)/H_{sp}$		0.0208	

(a)

变化范围 Var. scal.	SSD	变异成分 VC	变异比率 VP(%)	Φ_{st}
种群内 Among pop.	8164.116	5.3402	99.17	0.008
种群间 Within pop.	44.007	0.0443	0.82	

万方数据 (b)

存在巨大差异,在长期自然选择的作用下产生了广泛的遗传变异,种内具有丰富的遗传多样性。Hamrick 曾指出,具有高水平遗传变异的植物种多为寿命长、地理分布广、风媒授粉、结实性高和处于演替末期的物种,而马尾松具备了全部这些特征^[21,22];而种群间分化程度的不明显则可能主要有两点原因①供研究的群落分布在有限的地理范围内(海拔垂直范围仅为 200~830m),地理生态环境差异不大,受到的生境选择压力较小;②针叶树种的花粉迁移距离很大,故外部花粉(基因)迁入的可能性

表 4 三个马尾松种群间的遗传距离(Euclidean 系数)

Table 4 Genetic distances between 3 *Pinus massoniana* populations (Euclidean quotiety)

	L1	L2	L3
L1	0.0000		
L2	-0.0002	0.0000	
L3	0.0001	0.00051	0.0000

极大,频繁的基因流动减小了种群间的差异。这一结论与前人运用形态、生理、染色体和蛋白质大分子水平的遗传标记研究马尾松的遗传变异所得规律基本一致^[1,2,5~11]。

(2)马尾松种群的遗传多样性与样地土壤的总氮量呈显著负相关性,即土壤总氮量越高,种群遗传多样性越低,表明氮在维持马尾松种群遗传多样性方面可能起着较为重要的作用。由此可以初步设想,在森林自然演替过程中,当马尾松作为先锋种群最先在贫瘠的土壤中生长发展起来,形成马尾松纯林后,通过生境的不断改善(如土壤的总氮量的不断提高),马尾松种群的遗传多样性受到环境选择压力的作用而逐渐降低,在此过程中,群落逐渐按照针叶林、针阔叶混交林(以针叶林树种为主)、针阔叶混交林(以阳性阔叶树种为主)和常绿阔叶林的顺序演替发展,最终马尾松被排挤出群落。而在此过程中,马尾松种群的分布格局也发生着相应的变化,集群-高集群-趋于集群-随机分布(若最早由人工林发展而来,则分布格局最初为均匀分布^[3],即生态因子的变化、种群的宏观生态特征的演替与种群的基因组结构变异之间有着必然的内在联系。而本研究通过分析种群的遗传多样性与样地土壤的总氮量存在的显著负相关性表明,相对于总磷量等其它未能显现显著相关性的生态因子,氮元素作为一种限生长养分对马尾松种群的遗传多样性具有一定的选择压力。

表 5 3 个马尾松种群内遗传多样性与生态因子的相关性

Table 5 Relationship between genetic diversities within 3 *Pinus massoniana* populations and ecological factors

生态因子变量 Ecological variables	相关系数 Relationship quotiety
海拔高度 Altitude(m)	-0.93568
坡向 Aspect	0.640953
坡度 Slope	0.98522
pH 值 pH value	-0.53397
总氮 Total nitrogen(%)	-0.99905*
总磷 Total phosphorus(P ₂ O ₅ %)	0.465246
马尾松种群多度 (Number in population/100m ²)	0.845816

表 6 3 个马尾松种群间遗传距离与海拔差距的相关性

Table 6 Relationship of genetic distances between 3 *Pinus massoniana* populations and geographical distances(altitude distances)

	L1~L2	L2~L3	L1~L3
海拔差距 Altitude distances	320	310	630
种群间遗传距离 Genetic distances between populations	-0.0002	0.0001	0.0051
相关系数 Relationship quotiety		0.996968*	

(3)由于 3 个马尾松海拔梯度种群两两之间的遗传距离与海拔差距呈显著正相关性,即种群间海拔差距越大,其遗传距离越大,初步说明地理隔离对基因交流存在一定的阻碍作用。然而,由表 6 可知,种群间的遗传距离都很小(0.0001 和 0.0051),甚至为负值,说明种群间分化并不显著(这一结论与讨论(1)一致)。因此,遗传距离与海拔差距两者之间的关系还有待进一步的探讨。

由于本文的研究对象是 L1(200m)、L2(520m)、L3(830m) 3 个海拔群体,即研究群体和海拔垂直距离均较为有限,因此以上 3 点结论还不够成熟(例如:未能明确生态因子、种群遗传多样性和种群演替及格局的动态变化之间的相互作用关系)。因此,要进一步揭示马尾松种群生态学特征与其 DNA 水平之间的相关性,运用分子生物学资料深入分析其复杂的生态学现象,必须尽量扩大研究范围、丰富研究对象并不断完善统计分析方法,以期能更加科学地将宏观与微观相结合,不断发展分子生态学理论与方法。

参考文献

[1] 全国马尾松种源试验协作组. 马尾松种源变异及种源区划分的研究. 亚热带林业科技, 1987, 15(2): 81~89.

[2] 徐小春, 吴天林, 荣文琛. 马尾松全国第二次全分布区种源试验富阳点阶段报告. 浙江林业科技, 1989, 9(5): 9~14.

[3] 彭少麟. 南亚热带森林群落动态学. 北京: 科学出版社, 1996.

[4] 董 鸣. 缙云山马尾松种群年龄结构初步研究. 植物生态学与地植物学学报, 1987, 11(1): 50~58.

[5] 陈岳武, 陈维民, 等. 福建省马尾松群体和个体遗传变异的研究. 南京林产工业学院学报, 1982, 2: 29~40.

[6] 方永鑫, 方永鑫. 不同群体马尾松核型分化式样. 广西植物, 1990, 10(3): 201~207.

[7] 解荷锋. 马尾松天然群体的遗传结构. 南京林业大学学报, 1990, 14(4): 36~42.

- [8] 黄启强,王莲辉,等. 马尾松天然群体同工酶遗传变异. 遗传学报,1995,22(2):142~151.
- [9] 葛 颂,王明麻,陈乐武. 用同工酶研究马尾松群体的遗传结构. 林业科学,1988,24(4):399~409.
- [10] 陈天华,叶志宏,葛 颂. 马尾松不同海拔群体的核型分析. 南京林学院学报,1985,3:132~137.
- [11] 荣文琛,周志春. 福建省戴云山马尾松天然群体同工酶遗传变异的研究. 林业科学研究,1989,2(6):576~581.
- [12] 魏令波,唐 谦,等. 马尾松随机扩增多态性 DNA 标记的分离研究. 林业科学,1996,32(5):476~480.
- [13] 尹佟明,黄敏仁,等. 利用 RAPD 标记和单株树大配子体构建马尾松的分子标记连锁图谱. 植物学报,1997,39(7):607~612.
- [14] Ford E B. *Ecology Genetics*, 1st Ed. Methuen, London, 1964.
- [15] Merrell D J. *Ecology Genetics*. London:Longman, 1981.
- [16] 王伯荪,李鸣光,彭少麟. 植物种群学. 广州:广东高等教育出版社,1995. 122.
- [17] 季俊清. 植物遗传多样性保护及其分子生物学研究方法. 生态学杂志,1994,13(6):27~33.
- [18] Bachmann K. Molecular markers in plant ecology. *New Phytol.*, 1994,126:403~418.
- [19] Wayne R. Conservation genetics; apply anywhere. *World Conservation*, 1996,1:15~17.
- [20] 广东省科学院丘陵山区综合科学考察队. 广东山区植被. 广州:广东科技出版社,1991. 7.
- [21] Hamrick J L. In: *Genetics and Wild Pop. Manag.*, 1983.
- [22] Gurics R P and Ledig T. In: *Proc. Sym., Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects*. 1981,42~47.