

子遗植物桫欏种群遗传变异的 RAPD 分析

王 艇, 苏应娟, 李雪雁, 郑 博, 陈国培, 王伯荪

(中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘要:应用 RAPD 标记分析了桫欏分布在海南尖峰岭及霸王岭、广东塘朗山、黑石顶及大西山子遗种群的遗传变异。28 个引物共检测到 118 个位点, 其中多态位点 33 个, 多态位点比率 27.97%。Shannon 多样性、Nei 遗传分化和分子方差分析 (AMOVA) 结果一致显示尖峰岭种群遗传多样性最大, 霸王岭种群次之、塘朗山种群第三, 黑石顶种群第四, 而大西山种群最小。种群的遗传变异主要发生在种群间; Shannon 指数测出的种群间遗传多样性所占比率为 79.10% (基于表型频率) 和 77.85% (基于基因频率), Nei 基因分化系数 (G_{st}) 达 80.69%, 分子方差分析也表明种群分化极为显著 ($\Phi_{st}=0.8286, P<0.001$)。桫欏的种内遗传多样性水平很低, 种内 Shannon 多样性仅为 0.0641 (基于表型频率) 和 0.1124 (基于基因频率), 总基因多样性只有 0.0770。另外, Jaccard 相似性系数的 UPGMA 分析结果显示 5 个种群分为两个分支: 尖峰岭种群和霸王岭种群组成一支; 黑石顶、塘朗山和大西山种群组成另一分支, 并且三者中前两者的遗传关系更为密切。聚类分析结果还得到主成分分析的支持。根据桫欏种群的遗传变异特点, 初步探讨了保护策略。

关键词:桫欏; 种群遗传; RAPD 标记; 遗传变异

RAPD analysis of the genetic variation within populations of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae)

WANG Ting, SU Ying-Juan, LI Xue-Yan, ZHENG Bo, CHEN Guo-Pei, WANG Bo-Sun

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(6): 1200~1205.

Abstract: RAPD markers were used to assess genetic variation within and among relict populations of the tree fern *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae) from Jian Feng Ling (JFL) and Ba Wang Ling (BWL) in Hainan Province, as well as Tang Lang Shan (TLS), Hei Shi Ding (HSD) and Da Xi Shan (DXS) in Guangdong Province of southern China. Twenty-eight random primers detected 118 sites of which 33 (27.9%) were polymorphic. Calculations of Shannon diversity, Nei genetic differentiation, and AMOVA all consistently indicate that the JFL population possesses the greatest genetic diversity, followed in order by the BWL, TLS, HSD, and DXS populations. The genetic variation was found to be partitioned mainly among rather than within populations. Percentages of genetic diversity among populations as determined by Shannon index were 79.10% and 77.85% based on phenotype and gene frequencies, respectively. Nei's gene diversity coefficient (G_{ST}) was 80.69%. AMOVA also demonstrated that these relict populations are highly differentiated ($\Phi_{st}=0.8286, P<0.001$). Overall, very low levels of genetic diversity were detected

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170101); 国家自然科学基金重点资助项目(39830310); 广东省自然科学基金资助项目(011125)

收稿日期:2002-06-08; **修订日期:**2002-10-26

作者简介:王 艇(1969~), 男, 山西人, 博士, 副教授, 主要从事植物生物学研究。E-mail: lsswt@zsu.edu.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30170101); Key Project of National Natural Science Foundation of China (No. 39830310); Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. 011125)

Received date: 2002-06-08 **Accepted date:** 2002-10-26

Biography: WANG Ting, Ph. D., Associate Professor, working in the field of plant biology. E-mail: lsswt@zsu.edu.cn

within *A. spinulosa*. Shannon diversity within the species was 0.0641 from phenotype frequencies and 0.1124 from gene frequencies, whereas the corresponding total Nei gene diversity was 0.0770. UPGMA analysis based on Jaccard similarity coefficients showed that these five populations cluster into two groups: the JFL and BWL populations together, and the HSD, TLS, and DXS populations in a second cluster. The UPGMA results were also supported by a principle components analysis (PCA) of RAPD phenotypic data. A strategy for the conservation of *A. spinulosa* based on genetic diversity is proposed.

Key words: *Alsophila spinulosa*; genetic variation; population genetics; RAPD

文章编号:1000-0933(2003)06-1200-06 中图分类号:Q941,Q948 文献标识码:A

桫欏(*Alsophila spinulosa* (Hook.) Tryon)是桫欏科(Cyatheaceae)一种具高大主干的树形蕨类,俗称树蕨,是著名的子遗植物。在距今约 1.8 亿年前的中生代侏罗纪时期桫欏曾十分繁盛,经过第四纪冰川的侵袭,分布范围急剧缩小^[1]。作为起源古老的子遗植物,桫欏保留有一些独特的生物学性质。例如,孢子寿命短(仅有 7~8d),并且萌发条件也极为苛刻;从孢子萌发到幼孢子体形成生活周期长达一年以上,其间丝状体和原叶体缺乏保护性结构,极易被恶劣环境因子伤害;孢子萌发、配子体和胚胎的形成对生境要求非常严格,无发达根系,输导系统也较原始^[2, 3]。这些都显示它不能很好地适应现代气候条件和环境,只能在温暖、湿润、阴蔽的一些低纬度适宜生境中残存下来。幸存的桫欏数量十分有限,已被列为国家一级保护植物。然而,近些年由于经济利益的驱动,桫欏所受到的威胁在日益加深,不少种群濒于灭绝,设法有效保护这一古老的子遗物种已成为刻不容缓的课题。

揭示濒危物种的遗传多样性及遗传变异在种群内和种群间的分布能为制定相关的保护策略与恢复方案提供必要的理论指导^[4~6]。现在随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术已被广泛应用于分析植物种群的遗传结构。该技术对于珍稀濒危物种的研究具有一些潜在优势,它方法简捷、所费相对便宜而且可以检测到大量的多态位点,这对分析遗传变异水平低的物种很有意义。然而, RAPD 也有带型可重复性欠佳的不足。此问题可以通过反应条件的预研究得到较好控制。至于 RAPD 作为显性标记在数据分析方面的困难已被 Stewart 和 Excoffier 提出的方法较好地解决^[7]。

本研究利用 RAPD 标记分析了桫欏分布在海南和广东的部分子遗种群的遗传多样性及其在种内、种群内和种群间的分布,初步探讨了种群间的遗传关系,希望为开展这一古老子遗植物的分子生态学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

样本分别采自广东深圳塘朗山(TLS)、封开黑石顶(HSD)、英德大西山(DXS)和海南尖峰岭(JFL)及霸王岭(BWL)。塘朗山种群位于沟谷南坡,个体总数 57 株,沿小溪生长,范围 100m 内,株距 1~20m;黑石顶种群生长于河边,个体总数 8 株,株距 5~20m;大西山种群沿溪生长,个体总数 11 株,株距 10~100m;尖峰岭种群生长于海拔 800~850m 山林中的沟谷或溪边,个体总数 100 株,株距 5~50m;霸王岭种群生长于海拔 600~700m 山林中的瀑布边,个体总数 30 株,株距 5~10m。样本数总计 59 株,其中塘朗山种群随机选取样本 14 株,黑石顶种群选取全部 8 株个体为样本、大西山种群选取全部 11 株个体为样本、尖峰岭种群按不同海拔随机选取样本 16 株、霸王岭种群按不同海拔随机选取样本 10 株。随机选取样本时,样本间距离至少保持 5 m。采集的叶片材料硅胶或冰壶中贮藏、运输,至实验室后硅胶或-20℃保存。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 采用改进的十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)法^[8]。测定紫外光吸收以确定 DNA 浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。

1.2.2 引物的筛选 从上海生工公司合成的 60 个 10 碱基随机寡核苷酸引物中筛选出 28 个扩增产物稳定、重复性好的引物对所有样本的基因组 DNA 进行扩增。引物序列见表 1。

1.2.3 RAPD 扩增与检测 经预实验优化条件后确定反应体系为:总体积 25μl,其中 10×PCR buffer

(500mM KCl, 100mM Tris-HCl, 1.0% Triton X-100, 20mM MgCl₂) 2.5μl, 引物 (1.5μM) 0.3μl, dNTP (0.2 mM) 0.5μl, 模板 1μL (70ng), Taq 酶 0.5ul(0.5U),反应混合物用 20μL 石蜡油覆盖。扩增条件: 94℃ 200s 预变性; 94℃ 60s, 36℃ 60s; 72℃ 120s, 40 个循环; 72℃ 延伸 10min。所有反应在 Gene Amp PCR System 2400(Perkin Elmer Corporation) 上进行。扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察、照像。

1.3 数据分析

1.3.1 多态位点比率 在某一特定位点上,若扩增片段出现的频率小于 0.99,则此位点称为多态位点。多态位点比率即在所有检测位点中多态位点所占的比例。

1.3.2 Shannon 表型多样性指数 利用 Shannon 表型多样性指数计算种群内和种群间遗传多样性,计算公式为:

$$H = - \sum \pi_i \ln \pi_i$$

其中,π_i 为表型频率,即某一扩增带在第 i 个种群中出现的频率。

1.3.3 将 RAPD 标记视为等位基因的复等位基因位点,根据 Hardy-Weinberg 平衡求出基因频率矩阵,利用 PopGen32 软件计算基于基因频率的 Shannon 多样性、观测等位基因数、有效等位基因数、基因分化指数、种群内和种群间的基因多样性。

1.3.4 选用平方欧氏距离进行分子方差分析(AMOVA), AMOVA155 软件计算种群内、种群间的变异方差分布和 Φ 统计量距离(Φ_{st})。

1.3.5 采用 UPGMA 法对 Jaccard 相似性系数^[9]进行聚类分析。

1.3.6 对表型数据矩阵应用 NTSYSpc2 软件进行主成分分析(PCA)。

2 实验结果

用 28 个随机引物对 5 个桫欏种群共 59 个个体的基因组 DNA 进行的 RAPD 分析显示,每个引物测到的位点数在 1~8 个之间,扩增片段长度介于 300~3000bp。28 个引物共检测到 118 个位点,平均每个引物检测到的位点数为 4.21。28 个引物,有 7 个引物检测到多态性位点,占引物总数的 25%;检测到 33 个多态位点,多态位点比率 27.97%。

对于大西山种群,28 个引物中只有引物 S97 和 S512 分别检测到 2 和 1 个多态位点,多态位点百分率为 2.88%;黑石顶种群,引物 S64 和 S97 各检测出 2 个多态位点,多态位点百分率 3.96%;塘郎山种群,引物 S64 和 S97 分别检测到 4 和 2 个多态位点,多态位点百分率 5.94%;在霸王岭种群种,有 4 个引物 S64, S97, S145 和 S506 能分别检测到 1, 1, 4 和 1 个多态位点,多态位点百分率 6.60%;而在尖峰岭种群中,同是 4 个引物 S64, S97, S145 和 S506 能各自检测出 1, 1, 6 和 2 个多态位点,多态位点百分率为 9.09%。按检测到的多态位点百分率排序,所研究桫欏种群的顺序为:尖峰岭种群>霸王岭种群>塘郎山种群>黑石顶种群>大西山种群。

由不同引物的扩增带型估计出的 Shannon 表型多样性指数的取值范围变化较大,在 0~0.2383 之间变动。Shannon 表型多样指数反映,尖峰岭种群的平均遗传多样性最高(0.0276),霸王岭种群次之(0.0187),塘郎山种群第三(0.0089),黑石顶种群第四(0.0074),大西山种群最低(0.0044)。桫欏的平均种群内遗传多样性值为 0.0134,平均种内遗传多样性值为 0.0641。在总的遗传变异中,种群间遗传多样性占

表 1 RAPD 分析的随机引物及序列
Table 1 Random oligonucleotide primers and sequences for RAPD analysis

引物 Primers	序列 (5'→3') Sequences (5'→3')	引物 Primers	序列 (5'→3') Sequences (5'→3')
S12	CCTT GACG CA	S151	TCAG GGAG GT
S29	GGGTAACG CC	S152	TTAT CGCC CC
S46	ACCT GAAC GG	S155	ACGC ACAA CC
S61	TTCG AGCC AG	S165	TGTT CCAC GC
S64	CCGC ATCT AC	S283	ACAG CCTG CT
S65	GATG ACCG CC	S286	AAGG CTCA CC
S85	CTGA GACG GA	S291	AGAC GATG GG
S90	AGGG CCGT CT	S390	TGGG AGAT GG
S91	TGCC CGTC GT	S482	TCTG TCGG TC
S97	ACGA CCGA CA	S492	AGTA GGGC AC
S99	GTCA GGGC AA	S501	TGCG GGTCTT
S106	ACGC ATCG CA	S506	GTCT ACGG CA
S134	TGCT GCAG GT	S507	ACTG GCCT GA
S145	TCAG GGAG GT	S512	ACAG GTGC GT

79.10%,而种群内的遗传多样性仅占 20.90%(表 3)。各引物的扩增结果由基于基因频率的 Shannon 多样性指数估算出的值在 0~0.4420 之间变动;而且同样显示尖峰岭种群的平均遗传多样性最高(0.0359),霸王岭种群随后(0.0267),塘郎山种群第三(0.0235),黑石顶种群第四(0.0200),而大西山种群最低(0.0182)。种群间遗传多样性占总的遗传变异的 77.85%,种群内的遗传多样性仅占 22.15(表 3)。基于表型频率和基于基因频率的分析结果一致。

Nei 遗传分化指数估测的结果表明,各种群的基因分化率由高到低的顺序为:尖峰岭种群>霸王岭种群>塘郎山种群>黑石顶种群>大西山种群,基因分化系数 G_{ST} 取值 0.8069(表 4)。和上述 Shannon 多样性指数获得的结果也相吻合。

AMOVA 分析结果再度显示桫欏种群大部分的遗传变异发生在种群间(82.86%),只有 17.14%的遗传变异发生在种群内(表 5)。种群分化极为显著($\Phi_{st}=0.8286, P<0.001$)。

对 Jaccard 相似性系数用 UPGMA 法进行聚类分析的结果表明,5 个种群分为两个分支:(1)尖峰岭种群和霸王岭种群组成一支;(2)黑石顶、塘郎山和大西山种群组成另一分支,并且三者中前两者的遗传关系更为密切(图 1)。基于 RAPD 谱带表型的主成分分析(PCA)支持 UPGMA 聚类结果。图 2 显示依据每组分析中提取的前 3 个主成分获得的 3-D 分布图。图中尖峰岭和霸王岭种群的个体构成一群,黑石顶、塘郎山和大西山种群的个体构成另一群。

表 2 桫欏种内及种群内多态位点比率

Table 2 Percentage of polymorphic sites within species and populations of *A. spinulosa*

种群 Populations	样本数 Num. of samples	位点数 Num. of sites	多态位点 数 Num. of polymorphic sites	多态位点比 率 Percentage of polymorphic sites
大西山 DXS	11	104	3	0.0288
黑石顶 HSD	8	101	4	0.0396
塘郎山 TLS	14	101	6	0.0594
霸王岭 BWL	10	106	7	0.0660
尖峰岭 JFL	16	110	10	0.0909
总计 Total	59	118	33	0.2797

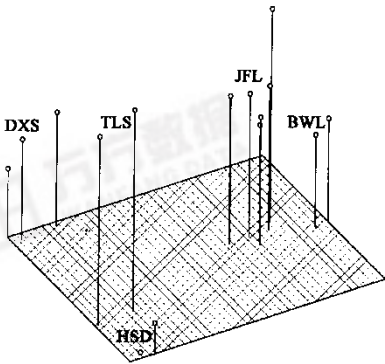
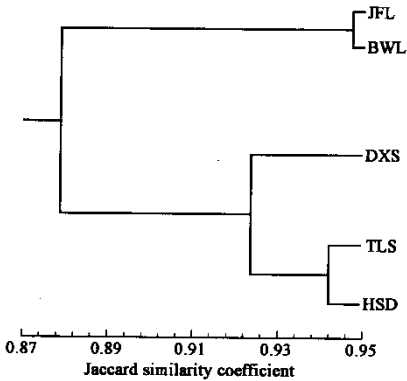


图 1 种群间 Jaccard 相似性系数经 UPGMA 法获得的树系图

图 2 基于 RAPD 表型特征的主成分分析(PCA)

Fig. 1 Dendrogram established from Jaccard similarity coefficients between populations by UPGMA method

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) based on RAPD phenotypic characters

3 讨论

通过濒危物种的种群遗传结构分析可以获得种群遗传多样性与遗传变异分布式样等方面的重要数据,这对实现物种的有效管理和制订合理的保护策略都极有参考价值。对冰川前子遗植物桫欏的部分种群,采用 RAPD 分子标记研究了它们种群内和种群间的遗传分化,并推测出相互间的遗传关系。所统计分析的谱带大小介于 300~3000bp 之间,它们扩增稳定、重复性好。基于不同分析方法求出的桫欏种群 Shannon 表型多样性指数、基因频率的 Shannon 指数、Nei 遗传分化指数和分子方差分析(AMOVA)得出的种群遗传多样性分布结果一致显示:尖峰岭种群遗传多样性最大,霸王岭种群次之,塘郎山种群第三,黑

石顶种群第四,大西山种群最小;而且种群间遗传多样性为主(在由 Shannon 表型多样性指数、基因频率的 Shannon 指数及基因分化系数求出的结果中,种群间遗传多样性所占比率分别为 79.10%,77.85%和 80.69%);AMOVA 分析同样表明种群分化极为显著($\Phi_{st}=0.8286, P<0.001$)。

表 3 Shannon 信息指数估计的桫欏种群遗传多样性

	大西山 DXS	黑石顶 HSD	塘朗山 TLS	霸王岭 BWL	尖峰岭 JFL	种群内遗传多样性 H_{pop}	种内遗传多样性 H_{sp}	种群内遗传多样性所占比率 H_{pop}/H_{sp}	种群间遗传多样性所占比率($H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$
表型频率多样性 ^①	0.0044	0.0074	0.0089	0.0187	0.0276	0.0134	0.0641	0.2090	0.7910
基因频率多样性 ^②	0.0182	0.0200	0.0235	0.0267	0.0359	0.0249	0.1124	0.2215	0.7785

①Diversity from phenotype frequencies;②Diversity from gene frequencies

表 4 桫欏种群的基因多样性

Table 4 Gene diversity of the populations of *A. spinulosa*

	观察等位基因数 Num. of allele	有效等位基因数 Num. of effective allele	基因分化率 H	种群内基因多样性 H_s	种群间基因多样性 D_{ST}	总基因多样性 H_T	基因分化系数 G_{ST}
大西山 DXS	1.0288	1.0288	0.0127	0.0149	0.0621	0.0770	0.8069
塘朗山 TLS	1.0594	1.0263	0.0153				
黑石顶 HSD	1.0339	1.0245	0.0137				
霸王岭 BWL	1.0678	1.0272	0.0167				
尖峰岭 JFL	1.0909	1.0325	0.0220				

尖峰岭、霸王岭及塘朗山种群的个体数目相对较多,检测出的遗传多样性也更丰富;而黑石顶及大西山种群的个体数目稀少,相应的遗传多样性则更贫乏。种群大小和遗传多样性之间的类似联系在其他研究中也有报道^[10, 11]。桫欏种群的遗传多样性主要分布在种群间,种群间分化明显,这是其遗传结构上的一个特点。对于蕨类植物种群,遗传变异主要分布于种群间的情形不乏例证。利用微卫星对铁线蕨(*Adiantum capillus-veneris*)的分析发现该植物具高水平的遗传多样性,并且变异主要发生在种群间而非种群内^[12]。里白科(Gleicheniaceae)假芒萁属植物*Sticherus flabellatus*也呈现种群间遗传变异为主(74.34%),种群内遗传变异较小(25.66%)的格局^[11]。但是,也有蕨类植物并非如此,小阴地蕨属的*Botrychium pumicola*就表现为种群内遗传多样性高,而种群间多样性低($F_{is}=0$ 时, $G_{st}=0.117$; $F_{is}=0.95$ 时, $G_{st}=0.0950$)^[13]。桫欏孢子微小,虽然借助水或风力可以传播较远距离,但是要跨越海南和广东种群间的地理阻隔仍很困难。而且即便孢子能够抵达新的区域,生境中湿度、温度及光照等因子的变化都可导致萌发孢子死亡^[3]。因此,空间隔离和缺乏新个体的迁入可能是造成桫欏种群分化的重要原因。另外,桫欏遗传多样性在种群间的高水平分布还可能与其繁育系统有关。桫欏属植物精子器和颈卵器产生的雌雄配子同时发育成熟提示它们有可能进行自体受精^[14]。自交必然会加大遗传多样性在桫欏不同种群间的分配。

桫欏种群遗传结构的另一特点是种内遗传多样性水平极低,基于表型频率和基因频率的 Shannon 指数分别为 0.0641 和 0.1124, Nei 基因多样性平均为 0.0161,只有其他蕨类植物遗传多样性的 40%^[12]。桫欏在侏罗纪时期曾经极为繁盛,但是由于第四纪冰川的侵袭,分布范围锐减,仅得以在热带、亚热带山区林地中残存。冰川后种群“瓶颈效应(bottleneck effect)”和“建群者效应(founder effect)”可能是导致桫欏遗传变异水平低下的主要原因。被片段化的种群由于遗传漂变和缺乏有效基因流致使种群内的遗传变异降

表 5 桫欏种群的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) for the populations of *A. spinulosa*

	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	百分比 Percentage	P 值 P-value
种群内 ^①	26.2908	0.8089	0.1714	<0.001
种群间 ^②	109.4527	3.9115	0.8286	<0.001

①Within population; ②Among populations

