

文章编号: 1001-1498(2007)05-0668-05

地涌金莲野生与栽培种群遗传多样性 RAPD 分析

潘庆杰¹, 李正红^{1*}, 王雁², 田杰¹, 谷勇¹, 刘秀贤¹

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要:利用 RAPD 分子标记技术对采自滇川两省的 12 个地涌金莲野生和栽培种群进行遗传多样性分析。选择 10 条随机引物在 12 个种群中共扩增出 88 条带, 其中多态性带 85 条, 整个种的多态性位点百分比 PPB 为 96.59%, 遗传多样性指数 H 为 0.289 0 以及 Shannon 信息指数 I 为 0.441 6。种群间的遗传分化系数 G_{st} 为 0.568 2, 即 43.13% 的遗传变异来自于种群内, 56.82% 的遗传变异来自于种群间, 种群间的遗传分化水平略高于种群内。种群间遗传一致度变化范围为在 0.66 ~ 0.95 之间。聚类结果显示: 野生种群之间遗传距离较近, 与地理分布基本相一致; 栽培种群遗传距离较远, 与地理分布不一致。

关键词:地涌金莲; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q75

文献标识码: A

RAPD Analysis on the Genetic Diversity of Wild and Cultivated Populations of *Musella lasiocarpa*

PAN Qing-jie¹, LI Zheng-hong^{1*}, WANG Yan², TIAN Jie¹, GU Yong¹, LIU Xiu-xian¹

(1. Research Institute of Resources Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was amplified to study the genetic diversity and genetic structure of *Musella lasiocarpa* based on twelve wild and cultivated populations. 10 primers were screened to use, and 88 bands were amplified, among which 85 were polymorphic. At specific level, the percentage of polymorphic bands, the genetic diversity index and Shannon information index were 96.59%, 0.289 0 and 0.441 6. The total gene differentiation (G_{st}) was 0.568 2, which indicated 43.13% of genetic variation resided within populations and slightly higher than that among populations. The genetic identity among populations ranged from 0.66 to 0.95. The results from cluster analysis showed that the genetic distance among wild populations was close, and was consistent with their geographical distribution pattern; the genetic distance among cultivated populations was far and was not consistent with their geographical distribution pattern.

Key words: *Musella lasiocarpa*; RAPD; genetic diversity; cluster analysis

地涌金莲 (*Musella lasiocarpa* (Fr.) C. Y. Wu ex H. W. Li) 是芭蕉科 (Musaceae) 地涌金莲属 (*Musella*) 的多年生大型丛生草本植物。为中国特有单种属, 主要分布于云南中部、西部和四川南部海拔 1 500 ~ 2 500 m 的山间坡地^[1~2]。株型端庄、高雅,

花序直立向上, 色彩富丽祥和似“金色莲花”, 具较高的观赏价值^[3]。佛教将其作为寺院中的“五树六花”之一^[4], 国外称其为“来自中国西南部的美丽异常、神奇无比的观赏植物”。地涌金莲具广泛的应用价值, 可作庭院绿化、盆栽及大型切花, 是优良的山

收稿日期: 2007-02-15

基金项目: 国家环保总局项目“中国重点观赏植物种质资源调查”(2004-11-07)的部分内容

作者简介: 潘庆杰(1980—), 女, 山东济南人, 在读研究生, 研究方向: 花卉种质改良。

* 通讯作者。

地护埂绿篱材料,花可食用和药用,干、叶可用于造纸和纺织^[5]。国内外对地涌金莲的研究相对较少,对其种群在形态、染色体、分子等不同层次的遗传多样性分析及新品种选育研究少见报道。虽然已有人对地涌金莲种群进行过同功酶分析,但所取种群数量较少,且未区分野生和栽培种群,不能正确反映地涌金莲的遗传多样性^[6,7]。本研究利用 RAPD 分子标记技术进行地涌金莲野生及栽培种群遗传多样性和遗传结构的分析,为地涌金莲引种驯化、遗传育种及栽培繁育等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料采集于云南和四川两省的 12 个地区(生境见表 1、图 1)。因野生种群多分布于悬崖峭壁的岩石缝隙,范围狭窄,故此材料为随机取样;栽培种群样株间距大于 20 m。各种群野外采集不少于 30 株,移栽于昆明中国林科院资源昆虫研究所温室,长出新叶后每种群随机取 20 株供试。

表 1 地涌金莲种群样本采集地概况

种群编号	采样地点	经度 (E)	纬度 (N)	海拔 /m	分布类型
AX	楚雄州元谋县凉山乡	101°58'	25°39'	1 600	野生
HC	丽江市华坪县温泉乡	101°21'	26°23'	1 462	野生
HQ	大理市宾川县宾居乡	100°35'	25°47'	1 430	野生
XR	攀枝花市盐边县箐河乡	101°38'	27°05'	1 200	野生
YM	丽江古城区金江乡	100°23'	26°37'	1 343	野生
WL	丽江市华坪县文乐乡	101°31'	26°30'	1 312	野生
LH	攀枝花市盐边县永兴镇	101°46'	26°05'	1 245	栽培
DZ	玉溪新平平甸乡	101°53'	24°05'	2 011	栽培
GS	楚雄南华县沙桥镇	101°05'	25°16'	1 950	栽培
GY	攀枝花市盐边县强胜乡	101°43'	26°02'	1 220	栽培
HM	安宁市青龙镇	102°15'	25°01'	2 180	栽培
SJ	红河州石屏县龙朋镇	102°47'	23°08'	1 428	栽培

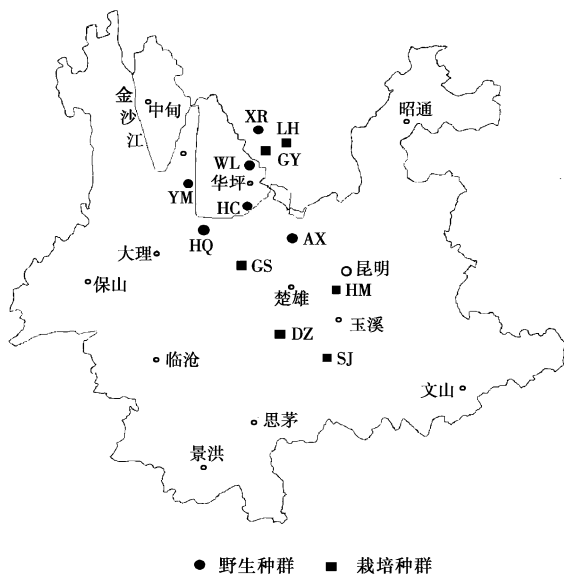


图 1 12 个地涌金莲种群分布地点

1.2 方法

实验利用随机扩增多态性 DNA 技术 (RAPD) 对地涌金莲野生和栽培种群进行遗传多样性分析^[8]。

1.2.1 基因组总 DNA 提取

采用改良 CTAB 法^[9]。

1.2.2 引物筛选与 PCR 扩增 从 12 个种群中各选一株个体的 DNA 作为模板,进行引物的筛选。最终从 120 个引物中筛选出 10 个扩增条带清晰、重复性好的引物对全部的 DNA 样品进行 RAPD 扩增反应(表 2)。

扩增反应采用 20 μ L PCR 反应体系: 10 \times Buffer 溶液 2.0 μ L; 25 mmol \cdot L⁻¹的 MgCl₂ 溶液 1.4 μ L; 10 mmol \cdot L⁻¹的 dNTP 溶液 0.5 μ L; 10 ng \cdot μ L⁻¹的随机引物 2.0 μ L; 1.0 μ L 模板 DNA (50 ng \cdot μ L⁻¹); TaqDNA 聚合酶 2 U; 加入灭菌的超纯水至 2.0 μ L。对照中用去离子水代替总 DNA。试剂 100 bp DNA Ladder Plus 和 DNA、dNTP、Taq 酶、引物、缓冲液购自上海 Sangon 公司,其余试剂为国产分析纯。

扩增在 MJ-PTC200 DNA 扩增仪上进行: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 40 个循环, 即: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 36 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 保存于 4 $^{\circ}$ C 完成整个 PCR 扩增。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 (电泳缓冲液为 1 \times TBE, 上样量为 4 μ L,

电压 90 V,时间为 90 min), 0.05%的 EB 染色后, UVP GDS-8000 凝胶成像系统观察、照相和分析,以 100 bp DNA Ladder Plus 作为标准。

表 2 RAPD 引物序列及扩增条带数

引物号	序列 (5' - 3')	条带数	引物号	序列 (5' - 3')	条带数
S2	TGATCCCTGG	14	S39	CAAACGTCGG	7
S8	GTCCACACGG	9	S45	TGAGCGGACA	3
S18	CCACAGCA GT	7	S62	GTGAGGCGTC	5
S21	CAGGCCCTTC	12	S93	CTCTCCGCCA	9
S31	CAATCGCCGT	10	S415	GACCTACCAC	12

1.2.3 数据分析 对地涌金莲的 12 个种群进行 RAPD 分析,电泳图谱中根据分子量标准对照反应产物在胶上的位置,估计扩增产物及其分子量。根据扩增片段的有无,选择清晰可辨的电泳带,每个样品的扩增谱带按有或无记录,“有带”赋值“1”,“无带”赋值“0”。利用 POPGENE 软件计算各个群体的平均观察等位基因数 N_a 、有效等位基因数 N_e 、基因多样性 H 、Shannon 信息指数 I 及多态位点百分比 PPB 等参数。根据种群间的遗传距离和遗传一致度对各个种群进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 地涌金莲种群间的遗传多样性

对 12 个地涌金莲野生和栽培种群、每个种群 20 株个体的 DNA 样品进行 RAPD 分析,共检测出 88 个位点,其中多态性位点 85 个,多态位点比率为 96.59%,片段大小在 310 bp 至 2 000 bp 之间变化,平均每个引物产生 8.5 个位点。从表 3 可以看出:在种的水平上地涌金莲的多态位点百分率为 96.59%,而总的种群平均多态位点比率为 37.03%;野生种群平均多态位点比率为 49.97%,高于栽培种群的 27.09%;野生种群 WL 的多态位点比率最高为 55.68%,栽培种群 SJ 的最低为 10.23%。

从表 4 可以看出地涌金莲种群水平平均观察等位基因数 N_a 是 1.370 3,物种水平是 1.965 9;种群水平平均有效等位基因数 N_e 是 1.211 5,物种水平是 1.483 3;种群水平平均遗传多样性指数 H 是 0.124 8,物种水平为 0.289 0;Shannon 信息指数 I 变化范围为 0.054 9 ~ 0.271 9,种群水

平值为 0.187 7,物种水平为 0.441 6。野生种群 WL 的 Shannon 信息指数 I 最高,种群 HC 的有效等位基因数 N_e 和遗传多样性指数 H 最高;栽培种群 SJ 的各项指标值最低,即遗传多样性水平最低。野生种群各项指标平均值高于栽培种群,说明野生种群的遗传多样性高于栽培种群。

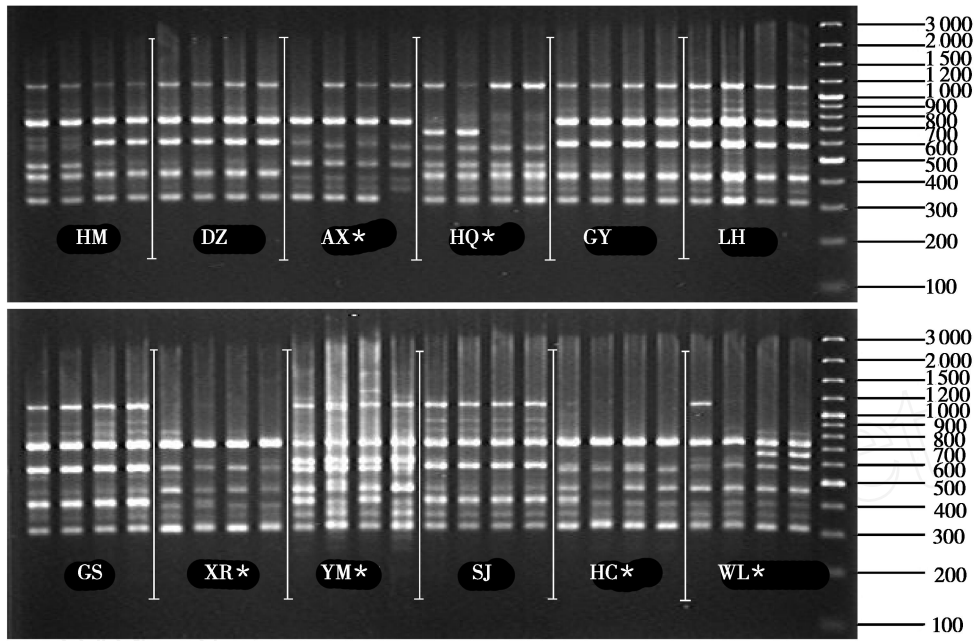
表 3 地涌金莲种群的 RAPD 遗传多态性

野生种群	多态位点	多态位点比率 PPB / %	栽培种群	多态位点	多态位点比率 PPB / %
AX	28	31.82	HM	37	42.05
HQ	39	44.32	DZ	31	35.23
XR	45	51.14	GY	27	30.68
YM	43	48.86	LH	20	22.73
HC	44	50.00	GS	19	21.59
WL	49	55.68	SJ	9	10.23
(平均值)	41	49.97	(平均值)	24	27.09
(总种群平均值)	33	37.03			
(物种水平)	85	96.59			

表 4 地涌金莲种群的遗传多样性

种群	N_a	N_e	H	I	
AX	1.318 2	1.208 9	0.119 8	0.176 6	
HQ	1.443 2	1.251 4	0.150 0	0.226 6	
XR	1.511 4	1.286 8	0.168 6	0.254 5	
野生种群	YM	1.488 6	1.280 2	0.162 2	0.243 4
	HC	1.500 0	1.307 8	0.180 0	0.268 0
	WL	1.556 8	1.292 3	0.178 2	0.271 9
	(平均值)	1.469 7	1.271 2	0.159 8	0.240 2
	HM	1.420 5	1.238 3	0.142 0	0.214 2
	DZ	1.352 3	1.195 7	0.113 2	0.170 4
	GY	1.306 8	1.177 2	0.107 1	0.161 3
栽培种群	LH	1.227 3	1.129 4	0.077 1	0.115 7
	GS	1.215 9	1.105 8	0.061 9	0.094 3
	SJ	1.102 3	1.064 4	0.037 2	0.054 9
	(平均值)	1.270 9	1.151 8	0.089 8	0.135 1
(总种群平均值)	1.370 3	1.211 5	0.124 8	0.187 7	
(物种水平)	1.965 9	1.483 3	0.289 0	0.441 6	

通过分析遗传多样性的各个指标,得出野生地涌金莲种群的遗传多样性明显高于栽培种群,如图 2 所示:引物 S62 对栽培种群 DZ、GY、LH、GS、SJ 扩增的 DNA 指纹图谱基本一致,但对野生种群扩增的图谱存在很大的差异,尤其种群 AX、HQ、YM、WL 内部个体之间也存在明显的差异。



*野生种群,其余的栽培种群

图 2 引物 S62对各个种群扩增的部分 DNA 指纹图谱

2.2 地涌金莲种群间的遗传分化

遗传分化系数 G_{st} 是衡量种群遗传分化常用指标,表示在总的遗传变异中种群间变异所占的比例^[10]。利用 POPGENE 软件对 RAPD 数据进行运算得出:总种群基因多样性 H_t 为 0.289 0,各种群基因分化指数 H_s 为 0.124 8。遗传分化系数 G_{st} 为 0.568 2,表明地涌金莲有 56.82% 的遗传来自于种群之间,43.18% 的遗传变异来自于种群内,种群间的遗传分化水平略高于种群内。

2.3 地涌金莲种群间的遗传关系

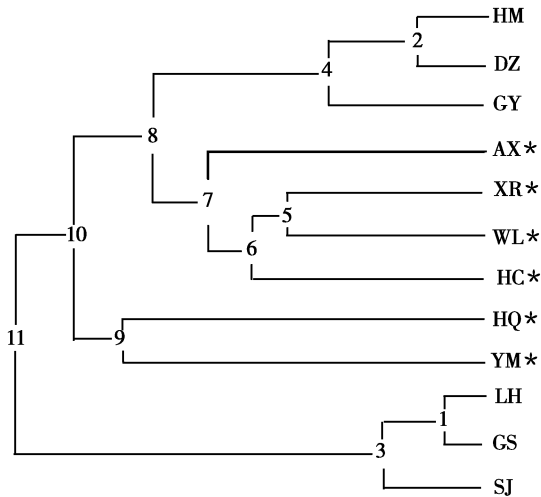
根据遗传距离的分析结果显示(表 5):各种群

间的相似度在 0.664 8~0.954 9 之间,平均为 0.799 2;各种群间的遗传距离在 0.046 1~0.408 3 之间,平均为 0.227 6。种群 HQ 和种群 GS 的遗传距离最远,而种群 LH 和种群 GS 的遗传距离最近。栽培种群被聚为两类, HM、DZ、GY 为一类, LH、GS、SJ 为一类,并且分列在 6 个野生种群的两端(图 3),说明栽培种群与野生种群之间存在一定的遗传变异。野生种群之间的关系与其地理分布位置基本一致,而栽培种群与其地理分布位置相差很大。

表 5 地涌金莲的种群的遗传一致度以及遗传距离

种群	HM	DZ	AX*	HQ*	GY	LH	GS	XR*	YM*	SJ	HC*	WL*
HM	—	0.941 0	0.879 9	0.780 0	0.888 7	0.774 9	0.757 9	0.855 4	0.797 7	0.759 1	0.841 9	0.840 2
DZ	0.060 8	—	0.814 5	0.736 6	0.927 0	0.773 3	0.746 5	0.837 8	0.731 5	0.787 4	0.803 5	0.812 5
AX*	0.127 9	0.205 1	—	0.757 0	0.762 2	0.733 6	0.721 0	0.877 5	0.797 4	0.717 1	0.837 1	0.836 3
HQ*	0.248 5	0.305 8	0.278 4	—	0.728 0	0.685 8	0.664 8	0.823 3	0.800 2	0.686 6	0.830 5	0.830 3
GY	0.118 0	0.075 8	0.271 5	0.317 4	—	0.867 1	0.834 4	0.827 8	0.739 1	0.867 8	0.806 3	0.775 1
LH	0.255 1	0.257 1	0.309 8	0.377 2	0.142 6	—	0.954 9	0.788 3	0.724 3	0.909 1	0.781 8	0.739 6
GS	0.277 2	0.292 3	0.327 1	0.408 3	0.181 1	0.046 1	—	0.747 9	0.755 1	0.914 4	0.756 6	0.700 1
XR*	0.156 2	0.177 0	0.130 7	0.194 4	0.189 0	0.237 9	0.290 5	—	0.774 1	0.773 1	0.895 1	0.902 8
YM*	0.226 1	0.312 7	0.226 4	0.222 9	0.302 4	0.322 5	0.280 9	0.256 0	—	0.756 3	0.818 9	0.796 9
SJ	0.275 6	0.239 1	0.332 6	0.376 0	0.141 8	0.095 3	0.089 5	0.257 4	0.279 3	—	0.759 7	0.709 4
HC*	0.172 1	0.218 8	0.177 8	0.185 7	0.215 3	0.246 2	0.278 9	0.110 8	0.199 8	0.274 9	—	0.894 2
WL*	0.174 2	0.207 6	0.178 8	0.186 0	0.254 8	0.301 6	0.356 6	0.102 2	0.227 1	0.343 3	0.111 9	—

注: *野生种群,其余为栽培种群;遗传一致度(斜线上)和遗传距离(斜线下)



*野生种群,其余为栽培种群
图 3 地涌金莲 12 个种群的 UPGMA 聚类

3 讨论

3.1 地涌金莲遗传多样性水平分析

1978年吴征镒院士把地涌金莲分离为一个新的属,芭蕉科就有芭蕉属 (*Musa* L.)、象腿蕉属 (*Ensete* Bruce ex Horan) 和地涌金莲 3 个属^[11]。在本研究中地涌金莲在物种水平上的 RAPD 多态位点百分率 (PPB) 为 96.59%, 所提供的遗传信息比已发表的地涌金莲等位酶分析的多态性比率 53.30% 高很多^[12], 比前人利用 AFLP 扩增芭蕉属的香蕉 (*Musa nana* Lour.) 得到多态位点百分率 78.5% 高^[13]。因此从分子水平上证实地涌金莲具有丰富的遗传多样性, 对环境具有较强的适应能力和很强的进化潜力。

3.2 地涌金莲野生和栽培种群遗传多样性成因分析

分析地涌金莲种群遗传多样性的各个指标, 可以看出野生地涌金莲种群的遗传多样性明显高于栽培种群。这一结果与野生种群和栽培种群的不同繁殖方式有着密切联系。野生地涌金莲以种子繁殖为主, 野外调查时发现有多数种子苗存在。刘爱忠在地涌金莲的传粉生物学中指出, 地涌金莲的传粉昆虫主要是蜜蜂 (*Apis cerana* Fabricius)、黄蜂 (*Vespa* spp.) 和大黄蜂 (*Bombus* spp.)^[6], 笔者也于野外观察到蜜蜂等昆虫在地涌金莲花上的授粉行为。由于蜜蜂等可进行远距离飞行, 促进了相邻地区之间的基因交流, 从而使得野生种群遗传多样性更为丰富。

地涌金莲栽培种群则以无性繁殖为主。地涌金莲具有根系发达、萌蘖多、分株易成活的特点, 栽培种群大多成行种植在田埂上、坡地边以护埂保土。

因其假茎肥大多汁, 可作猪饲料, 所以当地农民一般会把当年刚开花的植株砍伐喂猪, 而留其根部促发新芽, 利用萌蘖芽分株繁殖, 这种简单的分株繁殖使得十几丛甚至二、三十丛植株可能来自于同一母本, 邻近村落的植株也可能来源于最初的同一种植户, 从而造成栽培种群内遗传多样性较低。

3.3 遗传距离与地理位置的关系

野生地涌金莲种群之间的遗传距离与各种群的地理分布位置大致相符 (图 1)。地理位置较近的种群, 遗传距离也较近, 距离最近的 XR 和 WL 两地, 在表型上也最近。野外调查首次发现, 只有在 XR、WL 两地存在叶柄红色和苞片红色相连锁的变异植株, 这种性状在移栽于温室内 1 a 后仍表现稳定, 说明变异本质上可能由基因的改变引起, 而非环境饰变, 由此推测 XR、WL 两地的植株可能存在控制苞片红色的变异基因, 这有待于进一步研究。

栽培种群间的遗传距离与地理位置分布很不相符 (图 1)。其原因应与栽培种群来源不清有关, 这是人类活动的结果。即使栽培种群与野生种群地理位置相近, 也无法确定栽培种群就是来自于较近的野生种群。

参考文献:

- [1] 中国科学院昆明植物研究所 (主编: 吴征镒). 云南植物志 (第二卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第十六卷 第二分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1981: 3~6
- [3] 施宗明. 云南名花鉴赏 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1995
- [4] 杨培勤. 地涌金莲盛开在黔东 [J]. 花木盆景, 2001, 24 (12): 23
- [5] 张素芳, 念红忠. 云南特有园林植物地涌金莲的发掘与利用 [J]. 西南园艺, 2001, 29 (3): 35
- [6] 刘爱忠. 芭蕉科的系统演化与生物地理学 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2001: 60~70
- [7] 魏玉民. 中国蕉类种质资源形态学与分子生物学鉴定 [D]. 广州: 华南农业大学, 2002: 27~33
- [8] 甘四明, 施季森, 白嘉雨. 分子标记技术在林木常规育种中的应用及其问题 [J]. 生物工程进展, 1999, 19 (3): 49~51
- [9] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [10] 郑成木. 植物分子标记原理与方法 [M]. 长沙: 湖南科学出版社, 2003
- [11] 汤彦承. 中国植物区系与其他地区区系的联系及其在世界区系中的地位和作用 [J]. 云南植物研究, 2000, 22 (1): 1~26
- [12] Ai-zhong Liu, W John Kress. The ethnobotany of *Musella lasiocarpa* (Musaceae), an endemic plant of southwest China [J]. Economic Botany, 2003, 57 (2) 279~281
- [13] 于晓英, 易干军. 香蕉种质资源的扩增片段长度多态性鉴定与分类 [J]. 湖南农业大学学报, 2002, 28 (3): 206~210