

文章编号: 1001-1498(2008)04-582-05

乳源木莲种源遗传多样性和遗传分化

李因刚¹, 周志春^{1*}, 范辉华², 洪长胜³, 金国庆¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 福建省建瓯市林业科技推广中心, 福建 建瓯 353100; 3. 浙江省龙泉市林业局, 浙江 龙泉 323700)

关键词: 乳源木莲; 种源; 遗传多样性; 遗传分化; ISSR

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Analysis of Genetic Diversity and Differentiation for Provenances of *Manglietia yuyuanensis*

LI Yin-gang¹, ZHOU Zhi-chun¹, FAN Hui-hua², HONG Chang-sheng³, JIN Guo-qing¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 2. Extending Center for Forestry S & T of Jian 'ou City, Fujian Province, Jian 'ou 353100, Fujian, China; 3. Forestry Bureau of Longquan City, Zhejiang Province, Longquan 323700, Zhejiang, China)

Abstract: Genetic diversity and genetic differentiation of 11 *Manglietia yuyuanensis* provenances from main distribution area were analyzed using ISSR molecular markers. A total of 108 amplified loci were detected by 9 primers, of which the proportion of polymorphic loci was 86.11%. A high degree of genetic diversity in *M. yuyuanensis* was detected, and the genetic diversity index in species level was 0.2827, which was markedly higher than that of *M. decidua* and *M. patungensis*, the rare and endangered species belonging to the same genus with *M. yuyuanensis*. The result showed that there was significant difference in genetic diversity among provenances. Provenances from north and north-west Fujian province and the nearby area, including Shaxian, Jian'ou, Wuyishan of Fujian and Longquan of Zhejiang, had higher genetic diversity, which were the dominant regions to be protected and utilized. Small population effect brought by habitat fragmentation and distance isolation effect resulted in high genetic differentiation among provenances, which contributed to 25.89% of total genetic variation, and the differentiation within provenances contributed to 74.11% of total genetic variation. Results also showed that the genetic distance among provenances was not significantly related to the geographical distance among provenances. Based on the Nei's unbiased genetic distance, 11 provenances might be obviously divided into 3 clusters. Shaxian and Jian'ou of Fujian with high genetic diversity and large nature population was clustered into one group. The genetic distance among Huangshan of Anhui, Longquan and Kaihua of Zhejiang, Wuyishan, Shaowu and Liancheng of Fujian, and Lichuan and Longnan of Jiangxi was small, then the above provenances were clustered. Quannan of Jiangxi, located at the south of distribution area, was an individual provenance. Based on the characteristic of its wider leaves, it was conferred that Quannan provenance was mistaken for *M. fordiana* Oliv. in the course of seed collection.

Key words: *Manglietia yuyuanensis*; provenance; genetic diversity; genetic differentiation; ISSR

收稿日期: 2007-01-29

基金项目: 浙江省科技厅重大项目“速生丰产用材林良种的选育与应用示范”(2004C12022)专题“乳源木莲速生用材林良种选育与应用示范”和福建省林业厅科研项目“乳源木莲优良种植材料筛选应用研究”(闽林[2004]科8号-2)

作者简介: 李因刚(1980—),男,山东蒙阴人,硕士。

*通讯作者: 周志春(1963—),男,江苏丹阳人,博士,研究员,博士生导师。

乳源木莲 (*Manglietia yuyuanensis* Law) 属木兰科 (Magnoliaceae) 木莲属 (*Manglietia* Blume) 常绿大乔木, 是近年来发掘推出的优良乡土速生用材和生态造林树种, 自然分布于广东北部、湖南南部、江西南部、安徽南部、浙江和福建等地, 生于海拔 700 ~ 1 200 m 的阔叶林中, 其生长迅速, 适应性和抗寒性强, 树干通直圆满, 木材结构细, 纹理直, 耐腐性较好, 易加工, 是优良的建筑、家具和胶合板用材。与马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.)、木荷 (*Schinus superba* Gardn. et Champ.)、香樟 (*Cinnamomum camphora* (L.) Presl) 等树种比较, 乳源木莲的自然分布区较窄, 主要分布于我国亚热带地区的东南部, 在其西部, 分布有抗旱性较强的巴东木莲 (*M. patungensis* Hu), 而在其南部, 分布有速生、但抗寒性较弱的桂南木莲 (*M. chingii* Dandy) 等。

乳源木莲的相关研究侧重于育苗^[1-2]和造林技术^[3]等方面, 此外在材质材性^[4]、天然种群结构^[5-6]等研究方面也取得了较大进展, 然而良种选育工作处于起步阶段^[7]。虽然已有研究揭示了华木莲 (*M. decidua* Q. Y. Zheng) 和巴东木莲两种同属珍稀濒危树种的遗传多样性^[8-10], 但未涉及乳源木莲这一重要树种。林新春等^[8]和廖文芳等^[9]分别利用 RAPD 和 ISSR 分子标记研究发现, 自然分布区极窄且种群很小的华木莲遗传多样性较低, 何敬胜等^[10]则利用等位酶技术发现巴东木莲的遗传多样性也较低, 但却高于华木莲。ISSR 标记是一种广泛应用于物种鉴定^[11]、遗传多样性等^[12-13]研究的新型分子标记, 具有 DNA 用量少, 操作简单、实验成本低等优点^[14-15]。ISSR 引物的碱基序列比 RAPD 引物长, 退火温度高, 其产物的多态性比 RAPD 丰富, 而且比 RAPD 技术更为稳定可靠, 重复性更好^[16]。本文在乳源木莲种源苗期试验的基础上^[7], 利用 ISSR 分子标记研究和揭示其种源遗传多样性和遗传分化, 旨在为乳源木莲的遗传保育和遗传改良提供理论依据和科学指导。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验叶样取自浙江省龙泉市林科所 2 年生乳源木莲种源试验林, 具体参见文献 [7]。2006 年 4 月下旬, 每个种源随机选取 12 个单株, 分别采

集其顶端新发嫩叶, 将其放入装有生物冰袋的保温盒里。采样完毕后把装有样品的保温盒置于冰柜, 并及时装入大泡沫箱内带回实验室。

1.2 基因组 DNA 提取

每个单株取 0.5 g 新鲜嫩叶, 采用 CTAB 法^[17]提取总 DNA。提取的 DNA 溶于 1 × TE 缓冲液中, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 并在紫外分光光度计 (日本岛津 UV-2401PC) 下检测其质量浓度, 最后稀释至 20 ng · μL⁻¹, 用于 ISSR 分析。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增反应在 PTC-100TM 基因扩增仪上进行。ISSR 扩增反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 51 ~ 55 °C 退火 (退火温度随引物而定, 见表 1) 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 37 个循环, 72 °C 后延伸 7 min, 最后于 4 °C 下保存。PCR 反应经过比较和优化确定为 20 μL 体系: Taq DNA 聚合酶 0.5 U, dNTP 0.25 mmol · L⁻¹, 引物 0.4 μmol · L⁻¹, DNA 模板 120 ng, MgCl₂ 2.5 mmol · L⁻¹, 2% 甲酰胺。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 对照标准分子量 200 bp DNA Ladder (华美生物工程公司), 再经溴化乙锭染色, 最后利用 FR-200 紫外与可见光分析成像系统拍照记录结果。

1.4 引物筛选

所用引物为加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的第 9 套 ISSR 引物。每个种源随机选择 1 个 DNA 模板进行扩增筛选, 从 40 个 ISSR 引物中筛选出 9 个能产生多态、清晰且可重复条带的引物, 用于全部 11 个种源样品分析。各引物名称、退火温度、检测的位点数和多态性位点数见表 1。

表 1 用于检测乳源木莲遗传分化的引物

引物	序列 (5' - 3')	退火温度 / °C	位点数	多态位点数
UBC 809	(AG) ₈ G	52	11	11
UBC 812	(GA) ₈ A	51	9	8
UBC 835	(AG) ₈ YC	55	13	11
UBC 844	(CT) ₈ RC	54	11	10
UBC 848	(CA) ₈ RG	55	12	12
UBC 850	(GT) ₈ YC	54	11	8
UBC 853	(TC) ₈ RT	54	12	8
UBC 855	(AC) ₈ YT	54	15	13
UBC 857	(AC) ₈ YG	54	14	12

注: Y = (C, T), R = (A, G)。

1.5 数据统计与分析

ISSR 为显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。电泳图谱中的

每一条带视为一个标记,并代表一个引物的结合位点。按凝胶同一位置上 DNA 条带的有无进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,仅记录清晰且长度在 200~1 800 bp 范围的扩增带,建立 0/1 数据矩阵。

得到的 ISSR 数据矩阵用于以下分析:(1)将 ISSR 标记视为表征性状,应用 POPGENE (Tools for Population Genetic Analysis) 软件 (Version 1. 3. 1) 计算多态位点百分率 (PPL) 和 Shannon 信息多样性指数 (I); (2)将 ISSR 标记作为 2 个等位基因 (1 和 0) 的复等位基因位点^[18-19],基于 Hardy-Weinberg 平衡,删除基因频率小于 $3/N$ (N 为样本数, 132) 的条带后^[20],分别计算 Nei's 基因多样性指数 (H_E)、种源总基因多样性 (H_T)、种源内基因多样性 (H_S)、基因分化系数 (G_{ST}) 和 Nei's 遗传距离 (D); (3)基于 POPGENE 软件对种源间 Nei's (1978) 无偏遗传距离 (Unbiased Genetic Distance) 的估算,对 16 个种源进行 UPGMA 聚类分析; (4)用 AMOVA-PREP 软件计算个体间欧氏距离所得的输出文件 (距离文件、组文件、群体文件) 作为输入文件,用 W NAMOVA 1. 04 软件进行分子方差分析,估算种源间和种源内的分子遗传变异,并以种源为单位,采用 Mantel 检验分析 11 个种源间遗传距离和地理距离的相关性。

2 结果与分析

2.1 乳源木莲的 ISSR 遗传多样性

利用 9 条 ISSR 引物对 11 个乳源木莲种源共

132 个个体进行扩增,每条引物扩增出的位点数目为 9~15 条不等,条带片断大小在 350~2 000 bp 间。共检测到 108 个位点,其中 93 个位点是多态的。图 1 给出了引物 UBC835 的 ISSR 扩增产物在浙江开化种源样品中的分离谱带。

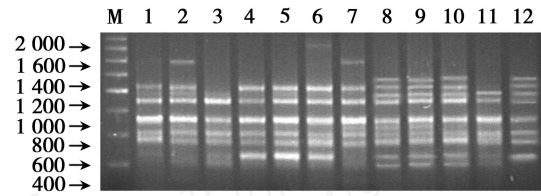


图 1 引物 UBC835 的 ISSR 扩增产物在浙江开化种源样品中的分离谱带

表 2 表明,在物种水平上,多态位点百分率 (PPL) 为 86.11%, Nei's 基因多样性指数 (H_E) 为 0.2827, Shannon 信息多样性指数 (I) 为 0.4353。种源水平上的多态位点百分率为 51.63%~68.52%, 平均为 61.79%, 福建武夷山种源多态性最高 ($PPL = 68.52%$), 福建沙县和安徽黄山 2 个种源次之 ($PPL = 66.67%$), 浙江开化种源多态性最低 ($PPL = 51.63%$), 最高值为最低值的 1.33 倍。种源的 Nei's 基因多样性指数 (H_E) 为 0.1898~0.2254, Shannon 信息多样性指数 (I) 为 0.2839~0.3462。11 个乳源木莲种源的 Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息多样性指数大小变化趋势与多态位点百分率基本一致。

表 2 11 个乳源木莲种源的遗传多样性

种源	经度 (E)	纬度 (N)	多态位点百分率 (PPL) / %	Nei's 基因多样性指数 (H_E)	Shannon 信息多样性指数 (I)
江西全南	114 52	24 75	54.85	0.1947	0.2870
江西龙南	114 79	24 91	62.96	0.2016	0.3064
福建连城	116 75	25 72	63.89	0.2082	0.31470
福建沙县	117 77	26 91	66.67	0.2170	0.3292
福建建瓯	118 32	27 05	62.11	0.2245	0.3317
江西黎川	116 91	27 30	60.19	0.2237	0.3291
福建邵武	117 98	27 34	57.41	0.2045	0.3054
福建武夷山	118 03	27 90	68.52	0.2254	0.3462
浙江龙泉	118 97	27 97	64.81	0.2127	0.3213
浙江开化	118 39	29 15	51.63	0.1898	0.2839
安徽黄山	118 10	30 20	66.67	0.2219	0.3337
种源水平			61.79	0.2112	0.3171
物种水平			86.11	0.2827	0.4353

相关分析表明:乳源木莲种源遗传多样性与其产地经纬度的相关性不显著,但仔细分析却发现,来自福建闽北和闽西北及其周边种源的遗传多样性相对较高。除福建邵武种源外,福建沙县、建瓯、武夷

山和浙江龙泉等种源的遗传多样性指数 (PPL 、 H_E 、 I) 均高于全部种源的平均值。这些种源的产地都保留有较大面积的天然种群,是乳源木莲现有的中心分布区。如在福建沙县的富口、高桥和大洛等乡镇

有数十公顷连片的乳源木莲天然林,而其它种源保留的天然种群较小,遗传多样性较低。

2.2 乳源木莲的遗传分化与基因流

POPGENE的分析结果表明:11个乳源木莲种源总的基因多样性指数(H_E)为0.2827,种源内基因多样性(H_S)为0.2103,种源间的基因分化系数(G_{ST})为0.2558,说明总的遗传变异中25.58%的变异存在于地理种源间,74.42%存在于地理种源内。

进一步利用 AMOVA 的分析结果(表 3)显示:

表 3 乳源木莲 11 个种源的 AMOVA 分析

变异来源	自由度	总方差	平均方差	变异组分	总变异百分率 / %	P
种源间	10	645.1364	64.514	4.34	25.89	<0.001
种源内	121	1503.5833	12.426	12.42	74.11	<0.001
总计	131	2148.7197				

2.3 种源间的聚类分析

在乳源木莲种源的 UPGMA 聚类(图 2)中,安徽黄山、福建连城、浙江龙泉、江西龙南、福建武夷山和福建邵武等种源的遗传距离较近,首先聚在一起;浙江开化和江西黎川,福建沙县和福建建瓯也各自聚为一类;而最南部的江西全南种源与其它种源遗传距离较远而自成一类。福建沙县、建瓯等产地的乳源木莲自然保留种群很大,遗传多样性较高,可能是乳源木莲的中心分布产区。江西全南种源地处乳源木莲分布区的最南端,与其它种源的遗传距离很远,这一种源叶片宽长,与乳源木莲典型的细长叶片形态有较大差异^[7]。对乳源木莲各种源间遗传距离和地理距离进行 Mantel 检验,结果表明遗传距离与地理距离间呈正相关,但相关性不显著($r=0.2765$, $P=0.1934$)。

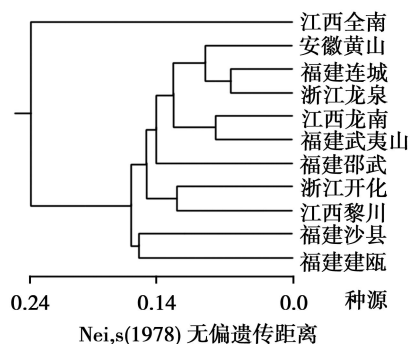


图 2 乳源木莲 11 个种源 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类

3 结论与讨论

乳源木莲是木莲属植物中分布相对较广的树

种,主要分布于我国东南部地区,其物种水平的遗传多样性较高,多态位点百分率(PPL)为86.11%, $Nei's$ 基因多样性指数(H_E)为0.2827。与之相比,同属的华木莲和巴东木莲是两种分布范围极狭的珍稀濒危种,遗传多样性很低。如华木莲仅分布在江西宜春洪江乡3个较小的种群中,总面积16 hm^2 ,因自然保留种群小、近交衰退严重而非有限的基因流致使华木莲遗传多样性低和遗传一致度高,其多态位点百分率(PPL)仅为17.28%,物种水平遗传多样性(H_E)仅为0.0647^[9];巴东木莲目前仅分布于湖北西部巴东县思阳桥村及西南部利川市毛坝,以及湖南西北部的桑植县天平山、张家界森林公园和重庆南川金佛山等地,遗传多样性虽高于华木莲,但显著低于乳源木莲,其多态位点百分率(PPL)为48.1%,物种水平遗传多样性(H_E)为0.192^[10]。乳源木莲不仅物种水平的遗传多样性高于华木莲和巴东木莲,而且种源或种群水平的遗传多样性也较高,且种源间遗传分化较大。如福建武夷山种源的多态位点百分率(PPL)高达68.52%,是种源平均水平的1.11倍及遗传多样性最低的浙江开化种源的1.33倍。

由于长期以来对天然阔叶林的过度开发,很多乳源木莲天然林资源遭到破坏,建议在尚存乳源木莲天然群落的地区建立自然保护区、保护小区或保护点,加强其天然林的保护,禁止乱砍滥伐。研究表明,乳源木莲种源遗传多样性与其产地地理经纬度相关性不显著,但发现地处闽北和闽西北及周边地区种源的遗传多样性一般较高。这一地区除福建邵武因种群较小原因外,福建沙县、建瓯、武夷山、浙江龙泉等种

源木莲种源间和种源内都存在显著的遗传变异($P < 0.001$),其中种源间变异占25.89%,种源内变异占74.11%,与利用 POPGENE 软件分析获得的结论基本一致,表明乳源木莲种源间存在较高分化的遗传分化,种源间的基因流较低,为0.7156。乳源木莲虽然分布于我国南方6个省区,但其天然种群通常呈不连续分布,地理距离较远,影响了种群间的基因交流,导致种源间产生较大的遗传分化。

源的遗传多样性指数 (PPL 、 H_e 、 I) 都较高, 这些种源细长的叶片形态非常典型, 可能是乳源木莲的分布中心。这些种源现有自然保留的种群很大, 应是今后乳源木莲遗传保育实施的重点区域, 应杜绝人工采种及移植行为, 保护其生境, 促进天然更新。乳源木莲种源分子聚类结果表明, 江西全南种源与其它所有参试种源的遗传距离较远, 单独聚为一类。在系统分类学上, 乳源木莲以前称为木莲 (*M. fordiana* Oliv.), 后由刘玉壶教授订正为乳源木莲, 与木莲的主要区别是其叶片较狭长, 叶背淡灰绿色^[1]。从形态来看, 本试验中的江西龙南种源叶片宽长, 与乳源木莲典型的细长叶片形态不同, 推测可能是在采种时误将木莲认为乳源木莲。

参考文献:

- [1] 叶桂艳. 中国木兰科树种 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [2] 金国庆, 周志春, 胡红宝, 等. 3种乡土阔叶树种容器育苗技术研究 [J]. 林业科学研究, 2005, 17(4): 387 - 392
- [3] 王忠平, 陈水龙, 赖培森, 等. 乳源木莲造林试验研究初报 [J]. 福建林学院学报, 1996, 16(4): 315 - 318
- [4] 周志春, 李建民, 陈炳星, 等. 几种亚热带速生乡土阔叶树种的制浆特性评价 [J]. 中国造纸, 2003, 22(2): 8 - 12
- [5] 陈存及, 曹永慧, 董建文, 等. 乳源木莲天然林优势种群结构与空间格局 [J]. 福建林学院学报, 2001, 21(3): 207 - 211
- [6] 曹永慧, 陈存及, 赖培森, 等. 乳源木莲天然林群落种间联结的研究 [J]. 福建林学院学报, 2003, 23(2): 124 - 127
- [7] 李因刚, 周志春, 金国庆, 等. 乳源木莲苗生长和形态的地理种源分化 [J]. 林业科学研究, 2007, 20(1): 35 - 39
- [8] 林新春, 俞志雄, 裘利洪, 等. 濒危植物华木莲的遗传多样性研究 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(6): 805 - 810
- [9] 廖文芳, 夏念和, 邓云飞, 等. 华木莲的遗传多样性研究 [J]. 云南植物研究, 2004, 26(1): 58 - 64
- [10] 何敬胜, 李作洲, 黄宏文. 濒危物种巴东木莲的等位酶遗传多样性及其保护策略 [J]. 生物多样性, 2005, 13(1): 27 - 35
- [11] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100: 1050 - 1060
- [12] Martins M, Tenreiro R, Oliveira M M. Genetic relatedness of *Portuguese almond* cultivars assessed by RAPD and ISSR markers [J]. Plant Cell Reports, 2003, 22: 71 - 78
- [13] Panda S, Martin J, Aguinagalde I. Chloroplast and nuclear DNA studies in a few members of the *B. brassica oleracea* L. group using PCR-RFLP and ISSR-PCR markers: a population genetic analysis [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106: 1122 - 1128
- [14] Wolfe A D, Liston A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology [M] // Soltis D E, Soltis P S, Doyle J J. Molecular systematics of plants II DNA Sequencing Nowell, M A: Kluwer Academic Publishers, 1998: 43 - 86
- [15] Harris J. RAPDs in systematics—a useful methodology? [M] // Hollingsworth P M, Bateman R M, Gornall R J. Molecular systematics and plant evolution London: Taylor and Francis, 1999: 221 - 228
- [16] Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 92: 40 - 45
- [17] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11 - 15
- [18] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531 - 6535
- [19] 钱 韦, 葛 颂. 居群遗传结构中显性标记数据分析方法初探 [J]. 遗传学报, 2000, 28(3): 244 - 255
- [20] Lynch M, Milligan B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers [J]. Molecular Ecology, 1994, 3(2): 91 - 99