

文章编号: 1001-1498(2009)01-0037-05

毛红椿群体遗传结构的 SSR 分析

刘 军¹, 陈益泰¹, 姜景民¹, 何贵平¹, 余国民²

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江省龙泉市林业科学研究所, 浙江 龙泉 323700)

摘要:利用 SSR 分子标记对分布在我国 7 个毛红椿群体进行了遗传结构研究。结果表明:毛红椿群体具有较低水平的遗传变异;毛红椿群体的等位基因的平均数为 6.1,有效等位基因数平均为 2.7,平均期望杂合度为 0.6006;毛红椿群体遗传分化系数 (F_{ST}) 平均值为 0.1854,在 F_{ST} 值的基础上估算毛红椿群体间的基因流 (N_m) 为 1.0983。采用平均距离方法 (UPGMA) 对 7 个群体进行了聚类,对各群体遗传距离与地理距离的相关分析表明:群体间遗传距离与地理距离显著相关。分析了毛红椿濒危的原因,并提出了保护策略。

关键词:毛红椿; SSR; 分子标记; 遗传结构

中图分类号: Q943

文献标识码: A

Study on Population Genetic Structure in *Toona ciliata* var. *pubescens* with SSR

LIU Jun¹, CHEN Yi-tai¹, JIANG Jing-min¹, HE Gui-ping¹, YU Guo-min²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Research Institute of Longquan City, Zhejiang Province, Longquan 323700, Zhejiang, China)

Abstract: Population genetic structure of seven natural populations of *Toona ciliata* var. *pubescens* was studied with simple sequence repeat (SSR) markers. The results showed that a low level genetic diversity was detected in the populations of *T. ciliata* var. *pubescens*. Average number of alleles and effective number of alleles (N_e) were 6.1 and 2.7 respectively. The mean expected heterozygosity was 0.6006. The major of genetic genetic variation occurred within populations, which could be concluded from the coefficient of genetic differentiation ($F_{ST} = 0.1854$). The level of gene flow (N_m) was 1.0983. Dendrogram based Nei's (1978) genetic distance was analyzed with UPGMA. Significant correlation was found between geographical distance and genetic distance. The reasons that result in endangered status were analyzed, and some conservation strategies were put forward.

Key words: *Toona ciliata* var. *pubescens*; simple sequence repeat (SSR); markers; genetic structure

了解濒危物种的遗传结构和遗传多样性水平,可以提高对群体动力学、适应和进化机制的认识,对探讨物种濒危机制、指导迁地保护和引种栽培以及群体的保护价值评估等有着重要意义^[1-2]。目前遗传结构研究已成为保护遗传学研究的热点^[3-6]。SSR 分子标记是一种基于 DNA 长度多态性的检测技术,具有共显性、高度可重复性、高度丰富的多态

性等优点,是构建遗传连锁图谱、研究群体遗传学、进行分子标记辅助育种和系谱分析的理想工具^[7-9]。

毛红椿 (*Toona ciliata* var. *pubescens* (Franch) Hand-Mazz) 是 楝 科 (Meliaceae) 香 椿 属 (*Toona* Roem.) 植物,为落叶大乔木,雌雄同株,花较小,花粉主要靠风力传播。果实为蒴果,成熟后自然开裂。

收稿日期: 2008-03-12

基金项目: 中国林业科学研究院院所基金 (RISF6808) 和浙江省重大科技专项 (2008C02004-2)

作者简介: 刘 军 (1977—), 男, 山东泰安人, 助理研究员, 主要从事珍贵阔叶树种遗传改良和种质资源方向的研究。

种子两侧具翅,翅为膜质,较轻,也主要依靠风力传播,主要依靠种子进行有性繁殖。毛红椿生长迅速,树干通直,素有“中国桃花心木”之称,材质曙红,木纹美丽,是珍贵的用材树种,具有很高的经济价值和开发前景。毛红椿主要分布于华南地区,在江西、浙江、云南、广东、福建等省有分布。由于环境变化、人为砍伐以及其天然更新比较慢,毛红椿数量不断减少,根据调查,仅在江西、云南和浙江有其天然林分布。在《中国植物红皮书》和《国家重点保护野生植物名录(第一批)》中,毛红椿被列为国家二级保护濒危种,也被各分布省列为珍惜濒危树种^[10-11]。目前毛红椿人工林的用种主要采自数量较少的天然林和人工林,所以进行系统的良种选育和分子生物学研究,扩大毛红椿的种植面积并研究其濒危原因,进而采取积极有效的保护措施是非常必要的。目前,

国内尚没有关于毛红椿群体遗传学方面的研究报告。本文利用 SSR 分子标记技术,运用群体遗传学原理,通过对 SSR 标记位点的统计与分析,首次从 DNA 水平上对毛红椿群体的遗传结构和遗传多样性进行了研究,为毛红椿遗传资源的保存、测定、评价和遗传育种提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2005年和2006年对分布江西、浙江和云南三省的7个群体毛红椿进行实地调查,7个群体情况和采样数量见表1。采样时单株间原则上相距50m以上,分单株采集母树中上部叶片,采下的叶片用硅胶迅速干燥,硅胶与叶片的质量比为10:1。

表 1 毛红椿 7 个群体地理位置和采样数量

群体	编号	经度 (E)	纬度 (N)	海拔高度 /m	采样数量 /个
江西宜丰	YF	114°29' ~ 114°45'	28°30' ~ 28°40'	220 ~ 475	65
云南宾川	BC	100°16' ~ 101°23'	25°02' ~ 25°22'	1 404 ~ 1 820	60
云南元谋	YM	101°49' ~ 101°52'	25°17' ~ 25°40'	1 112 ~ 1 230	30
云南武定	WD	102°08' ~ 102°12'	25°47' ~ 25°51'	1 405 ~ 1 802	29
云南师宗	SZ	103°42' ~ 104°34'	24°21' ~ 25°00'	812 ~ 912	84
浙江仙居	XJ	120°32' ~ 120°56'	28°48' ~ 28°56'	600 ~ 820	27
浙江遂昌	SC	119°12' ~ 119°23'	28°30' ~ 28°36'	510 ~ 1 220	25

1.2 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[10]。试验中采用 15 μ L 反应体系,成分:10 \times 缓冲液 1.5 μ L, Taq 酶 (2U \cdot μ L⁻¹) 0.3 μ L, dNTP (2.5 mmol \cdot L⁻¹) 1.8 μ L, 引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, DNA 模板 30 ng。用 BD-RED MYCYLE PCR 基因扩增仪扩

增,反应程序:先 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后进行 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所用 SSR 引物为本实验室设计并筛选的 8 对重复性好、扩增谱带清晰且稳定的多态性引物^[10], 引物的具体情况见表 2。

表 2 毛红椿基因组 8 个微卫星位点的 PCR 扩增引物

位点	GenBank 登录号	引物序列	重复序列	退火温度 / $^{\circ}$ C	等位基因大小 /bp
Tc01	DQ778303	F: TCAATGCAATTTAGGAGGAA R: TGCTTGTTGAACCTGTG	(GA) ₈	52	240 ~ 291
Tc02	DQ453904	F: TAGGAAAGGCAAGGTGGG R: GGGTGGTCGATGAGGGT	(AG) ₁₄	55	109 ~ 120
Tc03	DQ453907	F: GATTACGCCAGGCAACG R: TTGAAATGCGGAGAAAGGT	(CT) ₆	55	230 ~ 320
Tc04	DQ453906	F: GAAACCAAGCAGGCAAGC R: GAAAGGGGTGACGAG	(AG) ₁₀	55	110 ~ 230
Tc05	DQ453905	F: AGTAAATGCTGTGAGCAG R: AGAGTGGGGTGGTTCGATGAG	(AG) ₁₃	55	120 ~ 242
Tc06	DQ453903	F: ACTCTGACACTTATGCTGTG R: CTGGCGTAAATCATGGTCAATAC	(TTTCTC) ₇	55	121 ~ 231
Tc07	DQ453912	F: ATGGAATGATGTGCGATAGG R: TGTGATGATGAGTCTGAAC	(TC) ₇	55	182 ~ 280
Tc08	DQ453914	F: TGTCATGTTATGCTGGCGT R: CTGCCCAATCAACAAGAG	(TC) ₈	55	170 ~ 260

1.3 扩增产物的检测

PCR 扩增产物加入 5 μ L 左右的上样缓冲液 (loading buffer), 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 电压 120 V

电泳。电泳缓冲液为 1 \times TBE, 电压 120 V 电泳 3 h 后, 银染检测并用数码相机照相。

1.4 数据分析

微卫星是共显性标记,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。用 A、B、C、D、E.....按条带大小从大到小进行编号。群体遗传多样性分析包括群体内遗传变异水平的检测,群体间遗传分化等方面。采用 POPGENE version 1.31 软件计算在物种水平和群体水平的观察等位基因数目 (N_a)、有效等位基因数目 (N_e)、各位点的观察杂合度 (H_o)和期望杂合度 (H_e)、固定指数 (F_{IS})、基因分化系数 (F_{ST})、基因流 (N_m)。基于 POPGENE 软件计算群体间 Nei's 无偏遗传距离 (1978) 并进行聚类分析,利用 Mantel 检测计算群体间的遗传距离和地

理距离的相关程度。

2 结果与分析

2.1 毛红椿遗传多样性分析

扩增 8 个 SSR 位点,其中 Tc06 和 Tc07 位点等位基因数最多为 8 个,Tc02 位点的等位基因数最少为 4 个,所有观察等位基因的平均数 $A = 6.1$ 。有效等位基因数从 1.4 (Tc02) 到 3.6 (Tc07),平均有效等位基因数 $N_e = 2.7$ (表 3)。从表 3 可以看出:观察杂合度 (H_o) 变化范围为 0.334 4 ~ 0.865 6,平均为 0.627 5;期望杂合度 (H_e) 的变化范围为 0.292 2 ~ 0.719 9,平均为 0.600 6。

表 3 毛红椿遗传多样性、F 统计量

位点	等位基因数 (N_a)	有效等位基因数 (N_e)	固定系数 (F_{IS})	基因分化系数 (F_{ST})	期望杂合度 (H_e)	观察杂合度 (H_o)
Tc01	5	2.7	-0.138 9	0.269 0	0.629 9	0.596 9
Tc02	4	1.4	-0.340 1	0.114 9	0.292 2	0.334 4
Tc03	6	2.0	-0.097 5	0.063 1	0.508 0	0.537 5
Tc04	7	2.9	-0.579 1	0.183 0	0.660 5	0.865 6
Tc05	6	3.3	-0.490 0	0.419 2	0.696 8	0.602 0
Tc06	8	3.5	-0.262 8	0.102 5	0.714 5	0.806 5
Tc07	8	3.6	0.139 6	0.063 1	0.719 9	0.618 7
Tc08	5	2.4	-0.407 4	0.213 1	0.582 6	0.658 6
平均数	6.1	2.7	-0.247 9	0.185 4	0.600 6	0.627 5
标准差	1.457 7	0.766 7	0.233 7	0.121 7	0.143 9	0.162 7

对毛红椿 7 个群体的遗传多样性进行比较,从表 4 可以看出:云南元谋群体的遗传多样性最高 ($H_e = 0.658 4$),该群体的平均有效等位基因数为 2.9。云南师宗群体的遗传多样性最低,平均等位基因数为 3.8,有效等位基因平均为 2.0,期望杂合度 (H_e) 为 0.430 4。根据期望杂合度度量,毛红椿 7 个群体遗传多样性从大到小依次为:云南元谋 > 浙江遂昌 > 云南宾川 > 江西宜丰 > 云南武定 > 浙江仙居 > 云南师宗。

表 4 毛红椿 7 个群体遗传多样性比较

群体	平均等位基因数 (N_a)	有效等位基因数 (N_e)	期望杂合度 (H_e)	观察杂合度 (H_o)
YF	3.4	2.1	0.492 0	0.581 1
YM	4.4	2.9	0.658 4	0.632 4
BC	3.3	2.3	0.502 5	0.759 6
WD	3.1	2.2	0.490 0	0.684 8
SZ	3.8	2.0	0.430 4	0.592 6
XJ	2.6	1.9	0.445 8	0.596 8
SC	3.0	2.2	0.518 4	0.509 0
平均数	3.36	2.19	0.505 4	0.622 3
标准差	0.585 1	0.325 1	0.074 3	0.080 5

2.2 毛红椿遗传分化系数和基因流

SSR 位点上的变异量在群体间及群体内的分布情况,采用 Nei's (1987) 的 F 统计量 (F_{ST}) 对群体的遗传变异进行分析,群体间的基因流用 N_m ($N_m = (1 - F_{ST}) / 4 F_{ST}$) 表示。从表 3 中可以看到: F_{ST} 从 0.063 1 到 0.419 2,平均值为 0.185 4,即有 18.54% 的遗传变异存在群体之间,而有 81.46% 的遗传变异存在于群体之内。在 F_{ST} 值的基础上估算毛红椿群体间的基因流 (N_m) 为 1.098 3。

2.3 固定指数分析

固定指数 (F_{IS}) 反映居群的基因流、近亲繁殖情况等, F_{IS} 值变化在 -1 与 1 之间, F_{IS} 值越小,杂合子越多; F_{IS} 值越大,纯合子越高; F_{IS} 值为 0,则说明群体是随机交配的,等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡理论。从表 3 中可以看出: 8 个位点中除了位点 Tc07 固定指数为正值外,其它位点的固定指数值都为负数,平均值为 -0.247 9,表明毛红椿天然群体平均杂合度较高。

2.4 毛红椿群体间遗传相似性和遗传距离

为了进一步分析群体间的遗传分化程度,计算

了 Nei's 的遗传一致度 I 和遗传距离 D (表 5)。各群体的遗传一致度 I 为 0.576 1~0.987 7, 遗传距离 D 为 0.012 4~0.551 4, 7 个毛红椿群体间遗传距离均比较大。其中, 遗传距离最大的是浙江仙居与云南师宗群体, 遗传距离为 0.551 4; 江西宜丰与浙江仙居群体间遗传距离最小, 为 0.012 4。对各群体遗传距离与地理距离的相关分析表明, 群体间遗传距离

与地理距离显著性相关 ($r=0.730, P<0.05$)。

根据各群体间的 Nei's (1978) 遗传距离, 采用平均距离方法 (UPGMA) 对 7 个毛红椿群体进行聚类 (图 1)。从聚类图可看出: 北部 3 个群体江西宜丰、浙江仙居和遂昌聚在一起; 南部 4 个居群云南元谋、宾川、武定和师宗聚在一起。

表 5 群体间遗传相似性和遗传距离

群体	YF	YM	BC	WD	SZ	XJ	SC
YF		0.755 3	0.601 6	0.618 5	0.591 6	0.987 7	0.979 5
YM	0.280 7		0.766 9	0.784 3	0.740 9	0.741 2	0.748 5
BC	0.508 1	0.265 4		0.931 4	0.869 2	0.587 9	0.614 4
WD	0.480 5	0.242 9	0.071 0		0.928 6	0.603 9	0.629 3
SZ	0.524 9	0.299 9	0.140 2	0.074 1		0.576 1	0.592 1
XJ	0.012 4	0.299 5	0.531 2	0.504 3	0.551 4		0.942 9
SC	0.020 7	0.289 6	0.487 1	0.463 1	0.524 0	0.058 8	

注: 上三角数据为遗传一致度, 下三角数据为遗传距离。

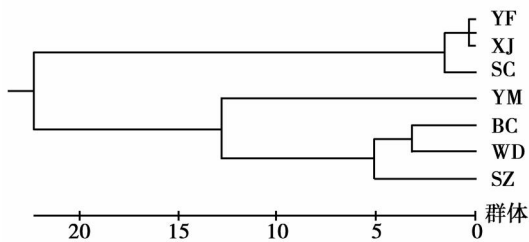


图 1 毛红椿 7 个群体 Nei's (1978) 遗传距离的 UPGMA 聚类

3 小结与讨论

3.1 毛红椿群体的遗传多样性

本文首次运用 SSR 分子标记对毛红椿 7 个群体遗传多样性进行分析, 对比国外利用微卫星研究椴科树种群体遗传变异的结果, 如大叶桃花心木 (*Swietenia macrophylla* King) 期望杂合度 (H_e) 为 0.657^[12]、0.851^[13], 圭亚那苦油楝 (*Carapa guianensis* Aubl) 期望杂合度 (H_e) 为 0.667^[14], 同时比较国内外利用 SSR 分子标记研究林木群体遗传变异的结果, 长寿命多年生、远交、种子靠风力传播植物期望杂合度 (H_e) 平均值为 0.647^[15], 毛红椿为长寿命多年生、远交、种子靠风力传播植物, 可以看出毛红椿天然居群具有较低水平的遗传多样性, 应加强对其的保护。在研究的 7 个群体中, 云南元谋群体遗传多样性最高, 这与该群体内所有单株年龄都比较大 (有的在 200 a 以上) 有关, 有效地保存了该物种的遗传信息; 其次为浙江遂昌、云南宾川和江西宜丰群

体; 云南师宗群体的遗传多样性最低, 这可能与该群体的人类活动频繁有关, 人为干预比较严重, 导致其遗传多样性降低。

3.2 毛红椿群体间的遗传分化

天然群体的遗传变异是基因流和选择作用的综合结果。同种植物各个群体空间上的隔离、突变、环境因子造成的选择差、随机遗传漂变、基因流的隔离等都能导致群体基因结构的异质性, 从而促进群体分化。毛红椿群体间的遗传分化系数为 0.185 4, 明显低于远交物种和多年生物种的平均值 ($G_{ST}=0.22$ 和 $G_{ST}=0.19$)^[15], 有 18.54% 的遗传变异存在群体之间, 而有 81.46% 的遗传变异存在于群体之内。在 F_{ST} 值的基础上估算毛红椿群体间的基因流 (N_m) 为 1.098 3。群体间基因流大于 1, 有效地阻止遗传漂变的发生^[16]。

3.3 毛红椿濒危原因和保护策略

根据华南各省的调查资料, 毛红椿在华南各省都有分布, 现存天然群体数量较少。由于自然环境的变化, 各地林业部门又缺乏管理和保护, 过度开发, 特别是旅游业的兴起, 导致大量天然林被毁, 毛红椿分布区不断缩小, 很多省份只有零星分布, 天然群体生境片段化; 加上毛红椿天然林更新缓慢, 最终导致毛红椿数量不断减少。

种质资源保存的主要依据是种内遗传多样性, 因此了解物种遗传变异的空间分布格局对于制定科学的保护策略具有重要作用。毛红椿群体的遗传多样性主要存在于群体内, 说明各群体有一定的独特

性,可为基因资源的保护和利用提供依据和指导。根据各群体期望杂合度显示结果,群体遗传多样性大体遵循云南元谋 >浙江遂昌 >云南宾川 >江西宜丰 >云南武定 >浙江仙居 >云南师宗的递减格局,说明云南作为现代毛红椿天然群体分布中心,由于数量相对较多,分布较为广泛,应加强对云南毛红椿天然群体的保护。

参考文献:

- [1] Petit R J, Mousadik A E, Pons O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers [J]. *Conservation Biology*, 1998, 12: 844 - 855
- [2] Grassi F, Cazzaniga E, Minuto L, *et al*. Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancreatium maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea [J]. *Biodiversity and Conservation*, 2005, 14: 2159 - 2169
- [3] Wang L, Guo J, Zhao G F. Genetic diversity of the endangered and endemic species *Psathyrostachys huashanica* natural populations using simple sequence repeats (SSRs) markers [J]. *Biochemical systematics and ecology*, 2006, 34: 310 - 318
- [4] England P R, Usher A V, Whelan R J, *et al*. Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana* [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11 (6): 967 - 977
- [5] Echt C S, Devemo L L, Anzidei M. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait [J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7 (3): 307 - 316
- [6] Hassanien H A, Gilbey J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites [J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36, (14): 1450 - 1457
- [7] Jame P, Lagoda P J L. Microsatellites from molecules to populations and back [J]. *Trends Ecol Evol*, 1996, 11: 424 - 429
- [8] Gupta P K, Balyan I S, Shama P C, *et al*. Microsatellites in plants—a new class of molecular markers [J]. *Curr Sci*, 1996, 70: 45 - 54
- [9] Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, *et al*. Genetic diversity and population structure of an insular tree *Santalum autrocaledonicum* in New Caledonia archipelago [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14 (7): 1979 - 1989
- [10] 刘 军, 孙宗修, 陈益泰, 等. 珍稀濒危树种毛红椿微卫星 DNA 分离及 SSR 反应体系优化 [J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26 (12): 50 - 55
- [11] 楼炉焕, 金水虎. 浙江古田山自然保护区种子植物区系分析 [J]. *北京林业大学学报*, 2000, 22 (5): 33 - 39
- [12] Novick R R, Dick C W, Lemes M R, *et al*. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis [J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12 (1): 2885 - 2893
- [13] Lemes M R, Gribel R, Proctor J, *et al*. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation [J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12 (11): 2875 - 2883
- [14] Dayanandan S, Dole J, Bawa K, *et al*. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae) [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8 (10): 1585 - 1592
- [15] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. *Molecular Ecology*, 2004, 13 (5): 1143 - 1155
- [16] Allendorf F W. Isolation, gene flow, and genetic differentiation among populations [M] // Schonewald-Cox C M, Chambers S M, MacBryde B, *et al*. *Genetics and Conservation*. Menlo Park, CA: Benjamin / Cummings, 1983: 51 - 65