

基于 RAPD 标记的 5 个南京椴居群遗传多样性分析

汤诗杰¹, 郑玉红¹, 汤庚国²

[1. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 2. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037]

摘要: 采用 RAPD 标记技术,对分布于江苏省(紫金山、牛首山和宝华山)及安徽省(皇藏峪和琅琊山)的 5 个南京椴(*Tilia miqueliana* Maxim.)居群的遗传多样性进行了分析,并采用 UPGMA 聚类方法研究了 5 个居群的遗传关系。结果表明:使用 10 条多态性引物从 5 个居群的总 DNA 中扩增出 169 条带,其中多态性条带 151 条,多态性条带百分率达 89.34%。各居群的多态性条带百分率(PPB)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性(h)和 Shannon's 多样性指数(I)均有明显差异,其中,宝华山居群的各项指标均最高,紫金山和牛首山居群的 PPB 值最低,琅琊山居群的 N_e 值最低,紫金山居群的 h 和 I 值均最低。5 个居群的 I 、 h 和 N_e 值分别为 0.243 0~0.335 1、0.154 4~0.218 2 和 1.248 9~1.362 7;在种水平上的 I 、 h 和 N_e 值分别为 0.359 4、0.223 6 和 1.352 9。居群内变异占总变异的 75.95%,居群间变异占总变异的 24.05%。居群内和居群间的基因多样性分别为 0.218 5 和 0.173 2,物种水平上的基因分化系数为 0.207 5,居群间的基因流为 1.909 3。各居群间的遗传距离差异较大;其中,皇藏峪与牛首山居群的遗传距离最近,仅为 0.026 5;宝华山与紫金山居群的遗传距离最远,为 0.134 4。通过聚类分析可将 5 个南京椴居群分为 3 支,宝华山和琅琊山居群各自独立为 2 支,皇藏峪、紫金山和牛首山居群聚为 1 支,且可进一步分为 2 个亚支,皇藏峪居群为 1 个亚支、紫金山和牛首山居群聚为 1 个亚支。研究结果表明:南京椴居群内的遗传多样性较高,但居群内的变异占主导地位,居群间存在明显的遗传分化。

关键词: 南京椴; RAPD 标记; 居群变异; 遗传多样性; 基因分化; 聚类分析

中图分类号: Q346+.5; S792.36.01 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2013)03-0070-05

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2013.03.11

Genetic diversity analysis on five populations of *Tilia miqueliana* based on RAPD marker TANG Shijie¹, ZHENG Yuhong¹, TANG Gengguo² (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2013, 22(3): 70-74

Abstract: Genetic diversity of five populations of *Tilia miqueliana* Maxim. distributed in Jiangsu Province (Baohuashan Mountain, Zijinshan Mountain and Niushoushan Mountain) and Anhui Province (Huangcangyu and Langyashan Mountain) was analyzed by RAPD marker, and genetic relationship among five populations also was studied by UPGMA cluster method. Results show that 169 bands are amplified from total DNA of five populations by 10 polymorphic primers, in which 151 bands are polymorphic bands with 89.34% of percentage of polymorphic band. Percentage of polymorphic band (PPB), effective number of alleles (N_e), Nei's gene diversity (h) and Shannon's diversity index (I) are obviously different among five populations, in which, all indexes of population in Baohuashan Mountain are the highest, PPB value of populations in Zijinshan Mountain and Niushoushan Mountain is the lowest, N_e value of population in Langyashan Mountain is the lowest, and h and I values of population in Zijinshan Mountain are the lowest. Values of I , h and N_e of five populations are 0.243 0-0.335 1, 0.154 4-0.218 2 and 1.248 9-1.362 7, respectively, and those in species level are 0.359 4, 0.223 6 and 1.352 9, respectively. Genetic variation within population accounts for 75.95% and that among populations accounts for 24.05% of total genetic variation. Gene diversity within population and among

收稿日期: 2012-09-13

基金项目: 江苏省林业三新工程项目(lysx[2012]14); 江苏省科技支撑计划项目(BE2008404)

作者简介: 汤诗杰(1969—),男,安徽东至人,博士,副研究员,主要从事园林观赏与生物多样性保护方面的研究。

populations is 0.218 5 and 0.173 2, respectively, gene differentiation coefficient is 0.207 5 at species level, and gene flow among populations is 1.909 3. Genetic distance among all populations differs obviously, in which, that between populations of Huangcangyu and Niushoushan Mountain is the nearest (only 0.026 5) while that between populations of Baohuashan Mountain and Zijinshan Mountain is the farthest (0.134 4). Five populations can be divided into three groups by cluster analysis, in which, populations of Bohuashan Mountain and Langyashan Mountain are separate two groups, while three populations of Huangcangyu, Zijinshan Mountain and Niushoushan Mountain are gathered into one group, which can be divided into two sub-groups further, one is Huangcangyu population and another contains populations of Zijinshan Mountain and Niushoushan Mountain. It is suggested that genetic diversity within *T. miqueliana* population is higher, but genetic variation within population play a dominant role and there is obvious genetic differentiation among populations.

Key words: *Tilia miqueliana* Maxim.; RAPD marker; population variation; genetic diversity; gene differentiation; cluster analysis

南京椴 (*Tilia miqueliana* Maxim.) 是椴树科 (Tiliaceae) 椴树属 (*Tilia* Maxim.) 树种, 为落叶乔木; 高 15 m; 叶卵圆形, 先端急短尖, 基部心形; 聚伞花序有花 3~12 朵; 倒披针形苞片长 8~12 cm, 下部与花序柄合生; 果实球形, 无棱, 被星状绒毛; 花期 7 月, 果期 10 月至 11 月^[1]。该种自然分布于江苏、浙江、安徽和江西等省, 是中国北亚热带混交林分布区东北边缘的组成部分。南京椴用途广泛, 可作为用材树种及蜜源植物, 更是优良的园林绿化和造林树种^[1-2]。但南京椴资源非常匮乏, 尤其是其野生居群非常少, 且居群规模小、更新情况差, 居群处于衰退状态^[3-5]。近年来, 南京椴作为优良园林树种越来越受到研究者关注, 相关的研究也越来越多, 尤其是有关该种繁殖技术方面的研究报道较多, 但有关南京椴遗传多样性的研究尚不多见^[6]。

研究居群间的遗传分化是探讨植物适应性、物种形成过程及进化机制的基础, 也是保护生物学和遗传资源学的核心^[7]。RAPD 标记是一种简单且有效的研究植物居群遗传多样性和遗传结构的方法, 广泛应用于植物种下变异及种内亲缘关系的探讨^[7-8]。为此, 在前期利用 ISSR 标记分析了 5 个南京椴居群遗传多样性^[6]的基础上, 作者拟采用 RAPD 标记进一步

揭示南京椴的遗传多样性和遗传分化现状, 为该种野生居群的保护以及野生资源的合理开发应用提供基础研究数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 5 个南京椴居群分别位于安徽省和江苏省, 5 个居群的基本概况见表 1。在各居群中随机选取 20~38 株南京椴样株, 在每一样株上分别采集位于植株中部且生长状况良好的健康嫩叶 8~10 片, 置于内装足量干燥剂的密封袋中, 密封后带回实验室, 于干燥处保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取 提取 DNA 前先将叶片主脉去除, 用体积分数 70% 乙醇擦去叶片表面灰尘。参照文献^[9]采用 CTAB 法提取总 DNA, 将获得的总 DNA 溶解于灭菌双蒸水中, 于 -20 °C 保存、备用。

1.2.2 引物选择 从上海生物工程技术有限公司设计生产的 60 个 RAPD 引物中选取扩增条带丰富、信号强的 10 个引物, 用于南京椴总 DNA 的 RAPD 扩增。

表 1 供试 5 个南京椴居群的基本概况

Table 1 Basic status of five populations of *Tilia miqueliana* Maxim. tested

居群编号 No. of population	采集地 Locality	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitude	株数 Number of individual
P1	江苏宝华山 Baohuashan Mountain of Jiangsu Province	E119°05'	N32°10'	156-320	38
P2	安徽皇藏峪 Huangcangyu of Anhui Province	E117°06'	N34°06'	180-248	37
P3	江苏紫金山 Zijinshan Mountain of Jiangsu Province	E118°50'	N32°02'	54-370	20
P4	江苏牛首山 Niushoushan Mountain of Jiangsu Province	E118°44'	N31°53'	186-209	29
P5	安徽琅琊山 Langyashan Mountain of Anhui Province	E118°18'	N32°12'	120-238	23

1.2.3 PCR 扩增与检测 使用 PE-9700 型 PCR 仪 (Perkin Elmer 公司) 进行 PCR 扩增, 扩增体系组成以及扩增反应程序均参照文献 [10] 进行设置并略加改进。PCR 产物用质量体积分数 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳 1 h, 然后用体积分数 0.1% EB 染色, 用 WV-BP330 型全自动凝胶成像系统 (江苏捷达科技发展有限公司) 拍照。

1.3 数据分析

根据 RAPD 扩增图谱统计每个引物扩增出的总条带数及其中的多态性条带数, 并计算多态性条带百分率。根据电泳图谱中 DNA 条带的有无, 将同一位点有条带的记为“1”、无条带的记为“0”, 组成二元数据矩阵; 应用 POPGENE 软件计算有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性 (h) 和 Shannon's 多样性指数 (I); 根据二元数据矩阵计算各居群间的遗传相似系数和遗传距离; 采用 UPGMA 法进行聚类分析。基于等位基因频率, 计算基因分化系数 (G_{st}) 和基因流 (Nm)。采用 AMOVA 1.55 软件进行分子方差分析。

2 结果和分析

2.1 RAPD-PCR 扩增结果分析

从 60 个引物中筛选出条带丰富且清晰的 10 个引物用于南京椴居群总 DNA 的 RAPD 分析, 10 个引物的 RAPD 扩增结果见表 2。由表 2 可见: 10 个引物扩增的条带数为 13~18 条, 其中多态性条带 12~17

表 2 用于 5 个南京椴居群 RAPD 分析的引物序列及扩增结果¹⁾
Table 2 Primer sequence used for RAPD analysis of five populations of *Tilia miqueliana* Maxim. and amplification results¹⁾

引物 Primer	5'→3'序列 5'→3' sequence	N	NPB	PPB/%
A18	AGGTGACCGT	18	17	94.44
AR03	GTGAGCGCA	18	17	94.44
B1	GTTTCGCTCC	18	17	94.44
B2	TGATCCCTGG	13	12	92.31
B4	GGA CTGGAGT	17	15	88.24
B8	GTCCACACGG	18	15	83.33
B11	GTAGACCGT	18	15	83.33
D03	GTCGCCGTCA	16	14	87.50
G17	ACGACCGACA	18	15	83.33
X03	TGGCGCAGTG	15	14	93.33
平均值 Average		16.9	15.3	89.34

¹⁾ N: 条带数 Number of band; NPB: 多态性条带数 Number of polymorphic band; PPB: 多态性条带百分率 Percentage of polymorphic band.

条, 多态性条带百分率为 83.33%~94.44%; 大多数引物扩增的条带数在 16 条以上, 平均每条引物扩增出 16.9 条带, 平均每条引物扩增出 15.3 条多态性条带。10 个引物共扩增出 169 条带, 其中多态性条带 151 条, 多态性条带百分率平均值高达 89.34%。

2.2 南京椴居群的遗传多样性分析

根据 RAPD 扩增结果对 5 个南京椴居群的遗传多样性指标进行分析, 结果见表 3; 5 个居群的分子方差分析结果见表 4。

由表 3 可见: 各居群的多态性条带数、多态性条带百分率、有效等位基因数、Nei's 基因多样性和 Shannon's 多样性指数均有明显差异, 其中, 江苏宝华山居群的各项指标均最高, 明显高于其他 4 个居群; 而多态性条带百分率以江苏紫金山和江苏牛首山居群最低, 有效等位基因数以安徽琅琊山居群最低, Nei's 基因多样性和 Shannon's 多样性指数均以江苏紫金山居群最低。5 个居群的 Shannon's 多样性指数为 0.243 0~0.335 1, 在种水平上的 Shannon's 多样性指数为 0.359 4; 5 个居群的 Nei's 基因多样性为 0.154 4~0.218 2, 在种水平上 Nei's 基因多样性为 0.223 6, 高于一般针阔叶树种的估算值 (0.206)^[11]; 5 个居群的有效等位基因数为 1.248 9~1.362 7, 在种水平上有效等位基因数为 1.352 9。表明南京椴居群的遗传多样性较高。

由表 4 的方差分析结果可见: 在南京椴种内, 居群间的变异占总变异的 24.05%, 居群内个体间的变异占总变异的 75.95%, 约为居群间变异的 3 倍, 说明南京椴居群内个体间的变异在其遗传变异中占主导地位。

2.3 南京椴居群的遗传距离和聚类分析

根据 RAPD 扩增结果组成二元数据矩阵, 对 5 个南京椴居群的遗传距离和遗传相似系数进行计算, 结果见表 5。结果表明: 安徽皇藏峪居群和江苏牛首山居群的遗传距离最近, 仅为 0.026 5; 江苏宝华山居群和江苏紫金山居群的遗传距离最远, 为 0.134 4; 所有居群遗传距离的平均值为 0.072 6。Thorpe^[12] 通过分析认为: 同种居群间的相似性一般为 0.80~0.97, 遗传距离一般为 0.03~0.20。因而, 虽然因环境差异和地理隔离等因素导致 5 个南京椴居群间存在一定的遗传分化, 但根据 Thorpe 的标准判断它们仍然属于同一地理群体。

表 3 基于 RAPD 标记的 5 个南京椴居群的遗传多样性分析结果¹⁾

Table 3 Analysis result of genetic diversity of five populations of *Tilia miqueliana* Maxim. based on RAPD marker¹⁾

居群编号 No. of population	采集地 Locality	NPB	PPB/%	<i>N_e</i>	<i>h</i>	<i>I</i>
P1	江苏宝华山 Baohuashan Mountain of Jiangsu Province	130	76.92	1.362 7	0.218 2	0.335 1
P2	安徽皇藏峪 Huangcangyu of Anhui Province	121	71.60	1.274 7	0.170 8	0.269 2
P3	江苏紫金山 Zijinshan Mountain of Jiangsu Province	103	60.95	1.249 1	0.154 4	0.243 0
P4	江苏牛首山 Niushoushan Mountain of Jiangsu Province	103	60.95	1.267 2	0.165 7	0.259 6
P5	安徽琅琊山 Langyashan Mountain of Anhui Province	108	63.91	1.248 9	0.156 8	0.249 0
	种水平 Species level	-	-	1.352 9	0.223 6	0.359 4
	标准差 <i>St. Dev</i>	-	-	0.300 6	0.159 1	0.218 4

¹⁾ NPB; 多态性条带数 Number of polymorphic band; PPB; 多态性条带百分率 Percentage of polymorphic band; *N_e*; 有效等位基因数 Effective number of alleles; *h*; Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity; *I*; Shannon's 多样性指数 Shannon's diversity index.

表 4 基于 RAPD 标记的 5 个南京椴居群的分子方差分析结果

Table 4 Analysis result of molecular variance of five populations of *Tilia miqueliana* Maxim. based on RAPD marker

变异来源 Source of variation	自由度 <i>Df</i>	平方和 Sum of squares	均方 Mean squares	方差组成 Variance component	方差比率/% Percentage of variance
居群间 Among populations	4	606.66	151.66	5.77	24.05
居群内 Within population	120	2 185.47	18.21	18.21	75.95

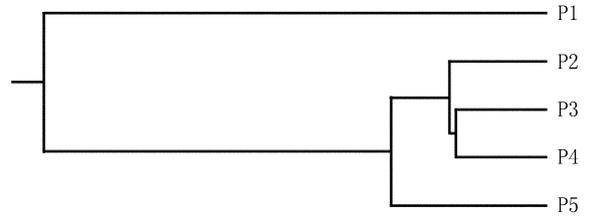
表 5 基于 RAPD 标记的 5 个南京椴居群的遗传相似系数和遗传距离
Table 5 Genetic similarity coefficient and genetic distance among five populations of *Tilia miqueliana* Maxim. based on RAPD marker

居群编号 ¹⁾ No. of population ¹⁾	各居群间的遗传相似系数和遗传距离 ²⁾ Genetic similarity coefficient and genetic distance among different populations ²⁾				
	P1	P2	P3	P4	P5
P1	-	0.883 9	0.874 3	0.876 5	0.880 9
P2	0.123 4	-	0.971 9	0.973 8	0.960 1
P3	0.134 4	0.028 5	-	0.973 8	0.947 7
P4	0.131 8	0.026 5	0.026 6	-	0.966 9
P5	0.126 8	0.040 7	0.053 7	0.033 7	-

¹⁾ P1; 江苏宝华山 Baohuashan Mountain of Jiangsu Province; P2; 安徽皇藏峪 Huangcangyu of Anhui Province; P3; 江苏紫金山 Zijinshan Mountain of Jiangsu Province; P4; 江苏牛首山 Niushoushan Mountain of Jiangsu Province; P5; 安徽琅琊山 Langyashan Mountain of Anhui Province.

²⁾ 横线上部数据为遗传相似系数, 下部的数据为遗传距离 Datums above horizontal line are genetic similarity coefficients and below genetic distances.

采用 UPGMA 聚类分析方法得到基于 RAPD 标记的 5 个南京椴居群的聚类图 (图 1)。由图 1 可以看出: 5 个南京椴居群明显聚为 3 支, 江苏宝华山和安徽琅琊山居群各自独立为 1 支, 安徽皇藏峪、江苏紫金山和江苏牛首山居群聚为 1 支; 且后者又可进一步分为 2 个亚支, 安徽皇藏峪居群为 1 个亚支, 江苏紫金山和江苏牛首山居群聚为 1 个亚支。这一聚类分析结果与基于 ISSR 标记的 5 个南京椴居群的聚类分析结果基本一致^[6]。



P1; 江苏宝华山 Baohuashan Mountain of Jiangsu Province; P2; 安徽皇藏峪 Huangcangyu of Anhui Province; P3; 江苏紫金山 Zijinshan Mountain of Jiangsu Province; P4; 江苏牛首山 Niushoushan Mountain of Jiangsu Province; P5; 安徽琅琊山 Langyashan Mountain of Anhui Province.

图 1 基于 RAPD 标记的 5 个南京椴居群的 UPGMA 聚类图
Fig. 1 UPGMA dendrogram of five populations of *Tilia miqueliana* Maxim. based on RAPD marker

2.4 南京椴居群的基因分化

在假设遗传平衡条件下, 根据 RAPD 扩增结果用 POPGENE 软件对 5 个南京椴居群的遗传分化进行分析, 结果显示: 在种水平上和居群水平上南京椴的基因多样性分别为 0.218 5 和 0.173 2; 居群间的基因分化系数为 0.207 5, 表明南京椴居群的总遗传变异中有 20.75% 存在于居群间, 有 79.25% 存在于居群内; 基因流为 1.909 3, 说明居群内的遗传交换较多。这是因为南京椴为优良的蜜源植物之一, 通过蜜蜂的采蜜和采粉增加了传粉概率并在一定程度上扩大了植株间的基因交流, 使居群内部的遗传变异增大。

3 讨论和结论

由以上实验结果可见:从反映物种遗传多样性的多个参数上,包括物种水平的 Shannon's 多样性指数(0.359 4)、Nei's 基因多样性(0.223 6)以及多态性条带百分率(89.34%)等,均表明南京椴种内的遗传多样性十分丰富,其中 Nei's 基因多样性还高于一般针阔叶树种的估算值(0.206)^[11]。南京椴的这一特性与其虫媒异交的繁殖特性有关,一般认为异交植物的遗传变异水平比自交植物高 3 倍左右^[10]。另外,相关的野外调查结果^[3-5]显示:南京椴居群遗传多样性的高低(以多态性条带百分率为指标)与其野生居群的规模有关,即与居群所包含的单株数量呈正相关。这一结果印证了“居群大则遗传多样性高,大居群有利于维持较高的遗传多样性”的研究结论。

基因分化分析结果表明:南京椴居群间的基因分化系数为 0.207 5,即南京椴种下的总遗传变异中有 20.75% 存在于居群间、79.25% 存在于居群内。AMOVA 遗传变异巢式方差分析结果则表明:南京椴居群间的变异占总变异的 24.05%,居群内个体间的变异占总变异的 75.95%,约为居群间变异的 3 倍。2 组数据均说明南京椴居群内个体间的变异在其遗传变异中占主导地位,也表明南京椴居群间存在着强烈的遗传分化。分析其原因有以下几点:第一,南京椴居群间的基因交换有限,居群间基因流仅为 1.909 3;一般认为具有有限基因流的物种其遗传分化大于具有广泛基因流的物种,有限基因流是导致居群分化的主要原因之一。第二,根据宋丛文等^[13]对珙桐(*Davidia involucrata* Baill.)居群的研究结果,珙桐由于受小居群效应以及缺乏有效基因流($Nm=1.423 9$)和致濒机制的影响,其居群间的遗传分化巨大,26% 遗传变异存在于居群间;同样,南京椴野生居群单株数量少,受小居群和缺乏有效基因流的影响,南京椴种内总变异的 24.05% 存在于居群间。第三,与南京椴的生物学特性有关,作为重要的蜜源植物之一,昆虫的传粉在一定程度上扩大了南京椴居群内部的基因交流,但限制了居群间的基因交流。

根据 RAPD 标记分析结果,对 5 个南京椴居群进行 UPGMA 聚类分析,但聚类分析的结果和其地理分布状况并不完全一致,这与南京椴的栽培历史和资源现状有关。野外调查结果显示:被调查的南京椴居群均分布在寺庙周围,这是因为南京椴是一个与佛教有关的树种,自唐代起就被广泛栽培,现存的居群可能是人工栽培后逸生并经过长期自然更新而形成的居群,而不是南京椴的原始野生居群,这些居群有可能来自同一个野生居群,很有可能具有相同的遗传背景。因此,基于分子标记进行聚类分析,其聚类结果很难与其地理分布相一致。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第四十九卷第一分册[J]. 北京:科学出版社,1989:68.
- [2] 唐亚,诸葛仁. 椴树属的地理分布[J]. 植物分类学报,1996,34(3):254-264.
- [3] 汤诗杰,汤庚国. 安徽皇藏峪自然保护区南京椴种群结构分析[J]. 植物资源与环境学报,2007,16(3):58-63.
- [4] 汤诗杰,汤庚国. 南京椴的资源现状及园林应用前景[J]. 江苏农业科学,2007(1):234-236.
- [5] 童丽丽,汤庚国,许晓岚. 南京牛首山南京椴群落的结构分析[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2006,30(5):42-46.
- [6] 汤诗杰,郑玉红,汤庚国. 基于 ISSR 标记的 5 个南京椴种群的遗传多样性分析[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2009,33(5):51-54.
- [7] 左志锐,穆鼎,高俊平,等. 百合遗传多样性及亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报,2005,32(3):468-472.
- [8] 李景欣,乌仁图雅,乌日娜. RAPD 分子标记技术在植物遗传多样性研究中的应用[J]. 畜牧与饲料科学,2004(6):57-59.
- [9] PATERSON A H, BRUBAKER C L, WENDEL J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP of PCR analysis[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2):122-127.
- [10] 穆立蕃,刘赢男,冯富娟,等. 紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学,2006,42(6):26-31.
- [11] 葛颂. 同工酶与林木群体遗传变异研究[J]. 南京林业大学学报,1988,12(1):68-77.
- [12] THORPE J P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1982, 13(1):139-168.
- [13] 宋丛文,包满珠. 利用 RAPD 标记对珙桐地理种群遗传分化的研究[J]. 林业科学研究,2004,17(5):605-609.

(责任编辑:惠红)