

长叶榧(*Torreya jackii* Chun)遗传多样性分析

叶冰莹¹, 庄振宏¹, 陈由强^{1,①}, 黄 丰², 陈如凯³

(1. 福建师范大学生物工程学院, 福建 福州 350007; 2. 福建师范大学图书馆, 福建 福州 350007;
3. 农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福建 福州 350002)

摘要 利用 RAPD 技术分析了长叶榧(*Torreya jackii* Chun)的遗传结构, 用 18 个引物对来自福建省泰宁县的 3 个不同居群的 66 个长叶榧样本进行分析。结果显示, 长叶榧群体水平的多态位点百分率达 87%, 居群水平的多态位点百分率分别为 83%、68% 和 80%。群体水平上的 Nei 基因多样性指数为 0.247 9, 居群水平上分别为 0.218 2、0.168 4 和 0.188 1。群体水平上的平均杂合度达到 0.244 7, 居群水平上分别为 0.221 5、0.172 9 和 0.195 0。30.35% 的遗传变异存在于居群间, 69.65% 的遗传变异存在于居群内。长叶榧居群的基因流量为 1.689 9, 显示长叶榧仍具有通过群体间的基因交流来防止遗传漂变造成的群体分化的能力。

关键词: 长叶榧; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2004)04-0001-05

Analysis of genetic diversity for *Torreya jackii* Chun by RAPD YE Bing-ying¹, ZHUANG Zhen-hong¹, CHEN You-qiang^{1,①}, Huang Feng², CHEN Ru-kai³ (1. Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 2. Library of Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 3. Key Laboratory of Sugarcane Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(4): 1-5

Abstract: The genetic diversity of *Torreya jackii* Chun was researched by RAPD. 18 primers were screened to amplify the genome of 66 samples of *T. jackii* from 3 populations in Taining County of Fujian Province. These primers detected 199 reproducible fragments among which there were 173 reproducible polymorphism fragments. The results showed that the percentage of polymorphic site at species level was 87%, and they were 83%, 68% and 80% at population levels respectively. Nei's gene diversity index was 0.247 9 at species level, and 0.218 2, 0.168 4 and 0.188 1 at population levels respectively. The heterozygosity was 0.244 7 at species level, and 0.221 5, 0.172 9 and 0.195 0 respectively at population levels. The percentage of genetic variance was 30.35% among *T. jackii* populations, and 69.65% within population. The gene flow index of the species was 1.689 9, it was suggested that the species still has the ability to recover from its endangered situation through promoting the genetic communication among populations.

Key words: *Torreya jackii* Chun; RAPD; genetic diversity

长叶榧(*Torreya jackii* Chun)是中国特有裸子植物, 又名浙榧、加氏榧, 属于红豆杉科(Taxaceae)榧树属(*Torreya* Arn.), 是距今约 2 亿年新生代第三纪的孑遗树种, 属东亚—北美植物区系的间断分布类型, 是濒临灭绝的珍稀树种, 为国家二级重点保护植物; 产于浙江和福建, 分布范围十分狭窄。长叶榧木材的边材为黄色, 心材为黄褐色, 纹理直, 结构细, 有弹性, 具檀香气味, 耐腐蚀耐水湿, 是造船、建筑、农具、器具和家具的优良用材。种子可榨油或炒食, 有驱除肠道寄生虫作用; 假种皮可提炼芳香油。长叶榧外形美观, 四季常绿, 是庭院观赏树种和盆景制作的良好材料^[1]。对长叶榧的研究主要包括其叶油的化

学成分、药理作用及抗菌作用等方面^[2-4]。

利用 RAPD 技术, 从遗传水平上分析长叶榧种群的变异状况, 可以及时揭示该种的种内遗传多样性(包括居群间和居群内)及遗传变异的分布规律, 准确了解其遗传结构, 为制定合理的保护措施提供科学的依据, 以便有效地保护这一濒临灭绝的物种,

收稿日期: 2003-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371177); 福建省教育厅科学基金资助项目(JB02165); 福建省自然科学基金资助项目(B0310004)

作者简介: 叶冰莹(1954-), 女, 福建南安人, 大专, 高级实验师, 主要从事植物生理学和植物分子生物学研究。

① 通讯作者

阻止其遗传多样性的进一步丧失。对于长叶榿遗传多样性的研究不仅对于其资源的保护及合理开发利用具有重要的指导意义,而且在研究植物区系分布、植物分类学及保护生物学等方面也有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

选择福建省泰宁县的许坊埂、许坊水库和将石自然保护区3个居群,采集了66个样本,样品为长叶榿(*Torreya jackii* Chun)当年生幼嫩叶。其中将石自然保护区33个样本,许坊埂19个样本,许坊水库14个样本。长叶榿RAPD分析所用的随机引物和引物序列见表1。

表1 长叶榿RAPD分析所用的随机引物和引物序列
Table 1 Sequence of the random primers used in RAPD analysis of *Torreya jackii* Chun

引物 Primer	5'-3'核苷酸序列 5'-3' ribonucleotide sequence	引物 Primer	5'-3'核苷酸序列 5'-3' ribonucleotide sequence
Sangon-24	AATCGGGCTG	Sangon-36	AGCCAGCGAA
Sangon-25	AGGGGTCTTG	Sangon-37	GACCGCTTGT
Sangon-26	GGTCCCTGAC	Sangon-38	AGGTGACCGT
Sangon-28	GTCACGTAGG	Sangon-39	CAAAGTCCGG
Sangon-29	GGTAACGCC	Sangon-104	GGAAGTCGCC
Sangon-30	GTGATCCAG	Sangon-118	GAATCGCCA
Sangon-31	CAATCGCCGT	Sangon-264	CAGAAGCGGA
Sangon-34	TCTGTGCTGG	Sangon-300	AGCCGTGGAA
Sangon-35	TTCCGAACCC	Sangon-340	ACTTTGGCGG

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取 取长叶榿嫩叶3g,在液氮中迅速研磨后,加入30mL 65℃提取缓冲液(含100mmol·L⁻¹醋酸钠、5.0mmol·L⁻¹ EDTA、5.00mmol·L⁻¹氯化钠、2% PVP、1.4% SDS和2% β-巯基乙醇,pH 5.5)置65℃浸提0.5~1.0h,于4℃ 4800r·min⁻¹离心20min,取上清液。加入2/3体积的2.5mol·L⁻¹醋酸钾(pH 4.8)溶液,0℃放置30min,于4℃ 4800r·min⁻¹离心20min,取上清液,加入0.6倍体积经-20℃预冷的异丙醇,温和混均后于-20℃放置20min,使核酸充分沉淀。然后在5000r·min⁻¹ 4℃离心20min,收集沉淀,用1.8mL灭菌去离子水溶解。加入1/10体积的3mol·L⁻¹醋酸钠(pH 5.2)及2.5倍体积的无水乙醇于-20℃放置2h或过夜,15000r·min⁻¹ 4℃离心10min。沉

淀用70%乙醇洗涤2~3次后空气干燥或抽干。沉淀溶解在0.1mL的TE缓冲液中备用。

1.2.2 PCR反应 PCR扩增的基本条件是:总体积15μL,反应系统内含50mmol·L⁻¹ KCl、10mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 9.0)、0.1% Triton-100、2nmol·μL⁻¹ MgCl₂、0.4nmol·μL⁻¹ dNTPs、0.75U *Taq* 酶、30ng引物(以上均为上海Sangon生物工程公司产品),约60ng长叶榿基因组DNA,引物为Sangon-300系列引物。扩增程序为:94℃预变性5min;然后于94℃变性1min,37℃退火1min,72℃延伸2min,38个循环;最后72℃延伸7min。RAPD反应在BIO-RAD Gene Cyclyer PCR仪上进行。

1.2.3 RAPD产物的检测 扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳,电场强度2.5V·cm⁻¹,溴化乙锭染色。然后用BIO-RAD GEL DOC 1000型凝胶成像系统进行检测并拍照。

1.3 数据处理和分析

将每个清晰可重复的DNA电泳条带记录下来并将其作为1个位点,若某个扩增产物在样品中出现,记作“1”,未出现的记作“0”。并且为了消除可能的假阳性,舍弃了小于200bp和大于2000bp的DNA条带^[5]。运用TFPGA(Tools for population analysis)、POPGENE 32(Population genetic analysis)和AMOVA 155(Analysis of molecular variance)3个分析软件对所得的数据进行分析。其中Nei基因多样性指数的计算参照文献^[6];期望杂合度按文献^[7]的方法计算;Shannon信息指数的计算参照文献^[8]进行;遗传距离和相似系数的计算及聚类分析参照文献^[9,10]的方法进行;基因分化系数和分化度及总群体的基因流量分别按文献^[11,12]的方法计算。

2 结果和分析

2.1 多态性分析

利用18个引物对分别来自3个不同居群的66个长叶榿样本进行扩增,共获得199个DNA片段,其中多态性片段丰富,达173条;每个随机引物扩增出4~16个片段,平均每个引物约提供11个RAPD标记的信息量,多态性片段3~16条。其中引物Sangon-264的扩增结果见图1。

18个引物的多态位点分析见表2。由表2可见,各引物扩增产物的多态位点百分率为46%~

100%,不同居群的多态位点百分率也分别达到了83%、68%和80%,而群体水平的多态位点百分率则高达87%。王维洋等用17个引物检测71个仅分布于台湾省南、北两端的台湾油杉(*Keteleeria formosana* Hayata)个体,得到该种的多态位点百分率为85%,与本实验所得的数据相近。长叶榧之所以具有较丰富的遗传多样性,这可能与属于雌雄异株植物,个体间的基因交流较频繁有关^[2]。

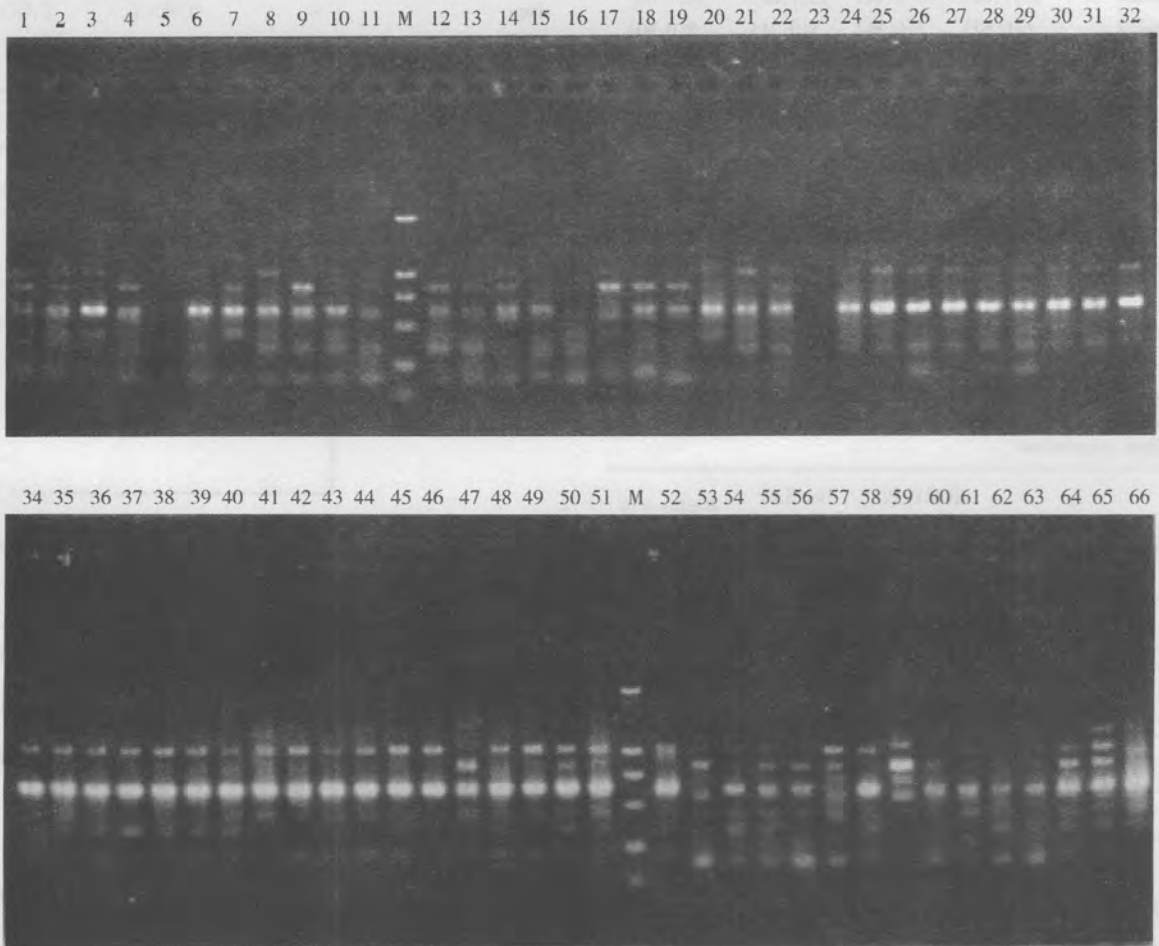
2.2 遗传多样性分析

2.2.1 Nei 基因多样性 利用 Nei 基因多样性指数对长叶榧3个居群进行分析,结果表明,居群水平的基因多样性指数最高为0.4994,最低为0。各居群中,将石自然保护区居群的基因多样性指数最高为0.4999,最低为0;许坊埂居群的基因多样性指数最

高为0.4997,最低为0;许坊水库居群的基因多样性指数最高为0.4976,最低为0。

应用TFPGA分析软件对3个长叶榧居群以及66个样本总体进行杂合度分析,结果表明(表3),不管是群体水平还是居群水平的杂合度都和Nei基因多样性指数分析相一致。群体水平的基因多样性指数为0.2479,而各居群也都具有一定的基因多样性,介于0.1684~0.2182之间。

2.2.2 Shannon 信息指数 应用软件POPGENE 32分析长叶榧居群的Shannon信息指数,结果表明,群体水平Shannon信息指数最高为0.6926,最低为0。3个居群中,Shannon信息指数最高值分别为0.6930、0.6928和0.6908,最低值均为0。它们的平均值如表4所示。



1-33:将石自然保护区居群 Jiangshi Natural Protection Section in Taining County of Fujian Province; 34-52: 许坊埂居群 Xufangeng in Taining County of Fujian Province; 53-66: 许坊水库居群 Xufang Reservoir in Taining County of Fujian Province; M: 分子量标准 Marker

图1 用引物 Sangon-264 对长叶榧样品进行扩增的 RAPD 图谱

Fig. 1 The RAPD pattern of *Torreya jackii* Chun populations amplified by primer Sangon-264

表 2 用 18 个随机引物扩增的长叶榧 3 个居群的多态位点¹⁾
Table 2 The polymorphic sites amplified in 3 populations of *Torreya jackii* Chun by 18 primers¹⁾

引物 Primer	多态位点数 Number of polymorphic site			总多态位点数 Total number of polymorphic site
	Pop1	Pop2	Pop3	
Sangon-24	16(1.00)	7(0.70)	11(1.00)	16(1.00)
Sangon-25	13(1.00)	7(0.88)	13(1.00)	14(1.00)
Sangon-26	5(0.83)	4(0.67)	5(0.83)	5(0.83)
Sangon-28	8(1.00)	5(0.71)	7(1.00)	8(1.00)
Sangon-29	6(0.46)	3(0.30)	1(0.13)	6(0.46)
Sangon-30	6(0.60)	4(0.44)	6(0.67)	9(0.75)
Sangon-31	7(0.78)	7(0.78)	1(0.17)	10(0.83)
Sangon-34	2(0.50)	5(0.63)	7(0.88)	7(0.88)
Sangon-35	8(0.89)	6(0.75)	6(0.86)	8(0.89)
Sangon-36	10(0.77)	8(0.67)	9(0.69)	12(0.86)
Sangon-37	9(0.90)	7(0.88)	5(0.71)	10(0.91)
Sangon-38	9(0.82)	9(0.82)	6(0.75)	10(0.83)
Sangon-39	10(0.91)	5(0.71)	10(0.91)	10(0.91)
Sangon-104	13(1.00)	10(0.91)	13(1.00)	14(1.00)
Sangon-118	6(0.67)	3(0.38)	5(0.71)	8(0.80)
Sangon-264	7(0.88)	6(0.75)	12(0.92)	12(0.92)
Sangon-300	3(0.75)	2(0.67)	2(0.67)	3(0.75)
Sangon-340	10(0.91)	7(0.64)	8(0.89)	11(0.92)
合计 Sum	148(0.83)	105(0.68)	127(0.80)	173(0.87)

¹⁾ Pop1: 将石自然保护区居群 Jiangshi Natural Protection Section in Taining County of Fujian Province; Pop2: 许坊坝居群 Xufanggeng in Taining County of Fujian Province; Pop3: 许坊水库居群 Xufang Reservoir in Taining County of Fujian Province. 括号中的数值表示多态位点百分率 The numbers in brackets indicate the percentage of polymorphic site.

表 3 长叶榧居群的 Nei 基因多样性和平均杂合度¹⁾
Table 3 Nei's gene diversity and average heterozygosity of *Torreya jackii* Chun populations¹⁾

居群 Population	取样株数 Number of tree sampled	Nei 基因 多样性指数 Nei's gene diversity	平均杂合度 Average heterozygosity
Pop1	33	0.218 2	0.221 5
Pop2	19	0.168 4	0.172 9
Pop3	14	0.188 1	0.195 0
总样本 Total	66	0.247 9	0.244 7

¹⁾ Pop1: 将石自然保护区居群 Jiangshi Natural Protection Section in Taining County of Fujian Province; Pop2: 许坊坝居群 Xufanggeng in Taining County of Fujian Province; Pop3: 许坊水库居群 Xufang Reservoir in Taining County of Fujian Province.

2.2.3 聚类分析 根据上述实验结果,对 3 个长叶榧居群的遗传距离和相似系数进行分析,结果见表 5。以遗传距离为基础进行聚类分析,结果表明(图 2),将石自然保护区的长叶榧居群和来自许坊水库的长叶榧居群的遗传距离(0.075 1)较近;而许坊坝居群与上述 2 个居群遗传距离(0.128 8)较远。

表 4 长叶榧居群的 Shannon 信息指数¹⁾
Table 4 The Shannon's information indexes of *Torreya jackii* Chun populations¹⁾

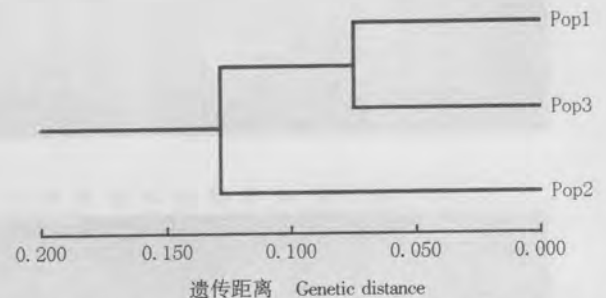
居群 Population	取样株数 Number of tree sampled	Shannon 信息指数 Shannon's information index
Pop1	33	0.335 0
Pop2	19	0.254 0
Pop3	14	0.289 1
总样本 Total	66	0.380 7

¹⁾ Pop1: 将石自然保护区居群 Jiangshi Natural Protection Section in Taining County of Fujian Province; Pop2: 许坊坝居群 Xufanggeng in Taining County of Fujian Province; Pop3: 许坊水库居群 Xufang Reservoir in Taining County of Fujian Province.

表 5 3 个长叶榧居群的相似系数和遗传距离¹⁾
Table 5 Genetic similarity indexes and genetic distance among of *Torreya jackii* Chun populations¹⁾

居群 Population	Pop1	Pop2	Pop3
Pop1	-	0.899 4	0.933 6
Pop2	0.106 1	-	0.869 7
Pop3	0.068 7	0.139 6	-

¹⁾ Pop1: 将石自然保护区居群 Jiangshi Natural Protection Section in Taining County of Fujian Province; Pop2: 许坊坝居群 Xufanggeng in Taining County of Fujian Province; Pop3: 许坊水库居群 Xufang Reservoir in Taining County of Fujian Province. 在“-”上方的数据为遗传相似系数,下方为遗传距离 The datums above “-” are the genetic similarity indexes and below are the genetic distance



Pop1: 将石自然保护区居群 Jiangshi Natural Protection Section in Taining County of Fujian Province; Pop2: 许坊坝居群 Xufanggeng in Taining County of Fujian Province; Pop3: 许坊水库居群 Xufang Reservoir in Taining County of Fujian Province

图 2 3 个长叶榧居群遗传距离聚类图
Fig. 2 The clustering diagram of the genetic distance of *Torreya jackii* Chun populations

2.3 居群内和居群间的遗传变异分布

应用 AMOVA 155 分析软件对 3 个长叶榧居群内和居群间的遗传变异分布状况进行分析,结果表明,长叶榧居群间的遗传变异量为 9.288 6,占 30.35%;居群内的遗传变异量为 21.316 1,占 69.65%,说明长叶榧居群间的变异小于居群内的变异,这一结果与基因分化系数 G_{st} (0.228 3)和分化度

F_{st} (0.221 2~0.327 0)的分析结果一致。

2.4 基因流量分析

运用 POPGENE 32 分析软件对长叶榧总群体的基因流量进行了分析,结果表明,长叶榧基因流量 N_m 的期望值为 1.689 9。

3 讨 论

由于过度开发,长叶榧的数量急剧减少,近 10 a 来,各长叶榧主要产地的资源数量损失达到 80% 以上^[1],不可避免地引起了长叶榧分布范围的缩小,使得分布在群体间的遗传变异较小,意味着该物种适应环境越来越狭小^[11]。然而,由于长叶榧属于雌雄异株植物,个体间的基因交流较频繁,所以该物种还保留了较高的遗传多样性,群体水平的 Nei 基因多样性指数可达到 0.247 9,Shannon 信息指数也达到了 0.380 7,其群体水平的多态位点百分率高达 87%,其基因流量 N_m 的期望值虽然不高,但也达到了 1.689 9。从理论上讲,若 $N_m > 1$,群体间的基因交流可以防止遗传漂变造成的群体分化^[12]。聚类分析表明,将石自然保护区居群与许坊水库居群相似系数较大,而和许坊埂居群的相似系数则较小,这和将石自然保护区地理位置与许坊水库邻近,而许坊埂居群则与前两者相距较远有关,表明相邻区系间还存在着一定的基因交流。因而只要及时制定合理

的保护措施,比如继续在长叶榧重点产地建立长叶榧自然保护区、保护小区(点),并且加强各长叶榧居群的相互联系,或者进行封山育林、划定禁伐区等^[1],长叶榧的居群数量可望得到恢复。

参考文献:

- [1] 高兆蔚. 我国特有树种长叶榧的生物学特性与保护问题研究[J]. 生物多样性, 1997, 5(3): 206-209.
- [2] 施小芳, 袁湘宁, 柯瑞荣. 长叶榧叶精油化学成分初步研究[J]. 福建林学院学报, 1989, 9(1): 85-88.
- [3] 陈振德, 郑汉臣, 田美兰, 等. 长叶榧叶挥发油成分分析及其抗菌作用研究[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(2): 150-153.
- [4] 陈仁通, 张与欢, 方圣鼎. 长叶榧叶中对人体 DNA 多聚酶 β 的抑制成分[J]. 中草药, 1997, 28(12): 707-710.
- [5] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国科学(C辑), 1996, 26(5): 436-441.
- [6] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89: 583-590.
- [7] 孟宪红, 孔 杰, 庄志猛, 等. 真鲷自然群体和人工繁殖群体的遗传多样性[J]. 生物多样性, 2000, 8(3): 248-252.
- [8] Lewontin R C. The apportionment of human diversity [J]. Evol Biol, 1972, 6: 381-398.
- [9] 吕雪梅, 杨关福, 张细权. RAPD 分析中遗传距离计算方法的比较[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(增刊): 90-97.
- [10] 朱 莉, 李汝刚, 伍晓明, 等. 我国部分白菜型油菜 RAPD 的研究[J]. 生物多样性, 1998, 6(2): 99-104.
- [11] 庞广昌. 群体遗传多样性和数据分析[J]. 林业科学, 1995, 31(6): 543-550.
- [12] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. Science, 1987, 236: 787-792.

《植物遗传资源学报》2005 年征订启事

《植物遗传资源学报》是由中国农业科学院和中国农学会联合主办的专业性学术期刊,由中国工程院院士董玉琛研究员担任主编。2000 年创刊,2003 年起国内外公开发行。国内刊号 CN11-4996/S,国际统一刊号 ISSN 1672-1810。

报道内容:大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用、草类植物及其一切经济植物的有关遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学、管理学等;以及起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

读者对象:从事植物遗传资源科学研究工作的人员,各有关大专院校的师生,农业行政和推广人员。

季刊,大 16 开本,2005 年由 96 页扩版至 108 页。定价仍为 10 元,全年 40 元。各地邮局发行,邮发代号:82-643。

本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加邮挂费 3 元。地址:北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部;邮编:100081;电话:010-62186657; 62180257; 62180279 (兼传真); 电子信箱:zwyczyxb2003@sina.com; zwyczyx2003@163.com。