

安徽羽叶报春与毛茛叶报春 的遗传多样性研究与新资源评估

张小平, 陈明林

(安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 采用 RAPD 方法对分布于安徽的珍稀濒危植物安徽羽叶报春 (*Primula merrilliana* Schltr.) 和毛茛叶报春 (*P. cicutariifolia* Pax) 的 10 个居群进行了 DNA 基因组多态性分析, 从 50 条 10 碱基随机引物中筛选出 14 条能扩增出稳定性和重复性好的 DNA 片段的引物, 共扩增出 85 条带, 其中多态性带 67 条, 占总数的 78.8%。安徽羽叶报春与毛茛叶报春的多态位点分别达到 71.6% 与 66.7%, 因而推测主要致濒因素可能不是通常认为的低水平的遗传多样性。采用 N-J 法对遗传距离构建的树状图进行聚类分析, 从分子角度证明了安徽羽叶报春与毛茛叶报春是 2 个自然的物种, 同时也说明了它们的遗传多样性与生境多样性的密切相关性。由于这 2 个物种具有地处黄山风景区的地理优势和花朵多、花期长、花姿优美等观赏性特点以及遗传优势, 如加以合理的开发与利用, 可以作为观赏花卉新资源。

关键词: 安徽羽叶报春; 毛茛叶报春; RAPD; 系统学意义; 观赏新资源

中图分类号: Q37; Q949.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)03-0001-05

A study of genetic diversity of *Primula merrilliana* and *P. cicutariifolia* with assessing new ornamental resources ZHANG Xiao-ping, CHEN Ming-lin (College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(3): 1-5

Abstract: *Primula merrilliana* Schltr. and *P. cicutariifolia* Pax are two rare and endangered species in Anhui Province of China. At present, there is a rapid decrease in quantity and distribution areas of the two species. Random amplified polymorphic DNA technique was used to analyze the genetic diversity of individuals from 10 natural populations of the two species. Fifty 10-mer arbitrary primers were screened out. 14 selected primers produced good polymorphic patterns and a total of 85 DNA bands were amplified, among which 67 were polymorphic (78.8%). The percentage of polymorphic loci of *P. merrilliana* and *P. cicutariifolia* are 71.6% and 66.7%, respectively, which shows that the genetic diversity decreasing may not be one of the major threatening factors. Dendrograms of populations of the two species were generated by using N-J methods. The results support the view that *P. merrilliana* and *P. cicutariifolia* are two separate species at molecular level, and demonstrate that genetic diversity is closely related to habitat diversity. Because the two species possess the geographic advantage, richness of flowers, the long span of flowering time and their greater genetic diversity, it is prosperous for the two species to be new ornamental resources.

Key words: *Primula merrilliana* Schltr.; *Primula cicutariifolia* Pax; RAPD; systematic significance; new ornamental resources

安徽省有报春花属 (*Primula* L.) 植物 2 种, 其中安徽羽叶报春 (*P. merrilliana* Schltr.) 为安徽省特有种, 并作为珍稀濒危物种被将要出版的《中国植物红皮书》第二卷收载^[1,2]; 而毛茛叶报春 (*P. cicutariifolia* Pax) 也被列为安徽、湖北及邻近地区的珍稀保护植物, 浙江省准特有种^[3,4]。

这 2 个种早春开花, 风韵别致, 是不可多得的观赏花卉新资源, 但据调查, 它们的种质资源急剧减少, 分布区日益缩小, 都处于濒危状态。目前, 安徽

羽叶报春只零星地散生于皖南山区, 而毛茛叶报春也呈岛屿状间断分布在皖南、浙江北部、江西、湖南、湖北及邻近的狭窄地区, 造成濒危的原因尚不清楚。本文采用 RAPD 标记技术来揭示它们的遗传特征,

收稿日期: 2003-02-27

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(98242017); 安徽师范大学生校青年基金资助项目(2002XQN47)

作者简介: 张小平(1956-), 男, 安徽泾县人, 博士, 教授, 主要从事植物学的研究与教学。

并对它们作为观赏新资源进行评估,从而为合理保护与利用这2种植物资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

安徽羽叶报春和毛茛叶报春各居群的采样地见表1。每居群各选5株,取0.5 g左右嫩叶放入经灭

菌的瓷研钵中,加入液氮研磨成细粉,分装于Eppendorf管中备用。凭证标本藏于安徽师范大学植物标本馆。

1.2 主要试剂

PCR扩增反应中,基因组Marker、PCRmarker、TaqDNA聚合酶、dNTP、 Mg^{2+} 、蛋白酶K、Rnase A和50条10碱基随机引物等购于南京生物工程技术服务有限公司。

表1 安徽羽叶报春和毛茛叶报春居群的采样地点

Table 1 Sources of populations of *Primula merrilliana* Schltr. and *P. cicutariifolia* Pax

居群编号 Population No.	种类 Species	采集地 Locality	海拔(m) Altitude	坡向 Aspect
01	<i>P. merrilliana</i>	石台县六都乡 Liudu Village, Shitai County, Anhui Province	200	阴坡 Northern slope
02		太平县郭村 Guocun Village, Taiping County, Anhui Province	400	阳坡 Southern slope
03		太平县贤村 Xiancun Village, Taiping County, Anhui Province	300	阴坡 Northern slope
04		太平县谭家桥 Tanjiaqiao Village, Taiping County, Anhui Province	400	阴坡 Northern slope
05		黄山桃花峰 Taohuafeng of Huangshan Mount, Anhui Province	800	阴坡 Northern slope
06		宁国县板桥拔刀坑 Badaokeng, Banqiao, Ningguo County, Anhui Province	700	阴坡 Northern slope
07	<i>P. cicutariifolia</i>	宁国县板桥拔刀坑 Badaokeng, Banqiao, Ningguo County, Anhui Province	700	阴坡 Northern slope
08		宁国县板桥鬼门关 Guimenguan, Banqiao, Ningguo County, Anhui Province	400	阴坡 Northern slope
09		浙江杭州灵隐寺 Lingyinsi in Hangzhou, Zhejiang Province	600	阴坡 Northern slope
10		宁国县板桥小天堂 Xiaotiantang, Banqiao, Ningguo County, Anhui Province	1 000	阴坡 Northern slope

1.3 PCR扩增程序

采用CTAB法提取DNA^[5],扩增程序为:94℃预变性5 min,94℃变性1 min,36℃退火2 min,72℃延伸2 min,40个循环,最后72℃延伸5 min,再于4℃保存。RAPD扩增产物经1.4%琼脂糖凝胶(含0.5 μg/mL EB)分离,紫外透射灯观察,选取稳定性和重复性好的谱带进行拍照。

1.4 统计分析

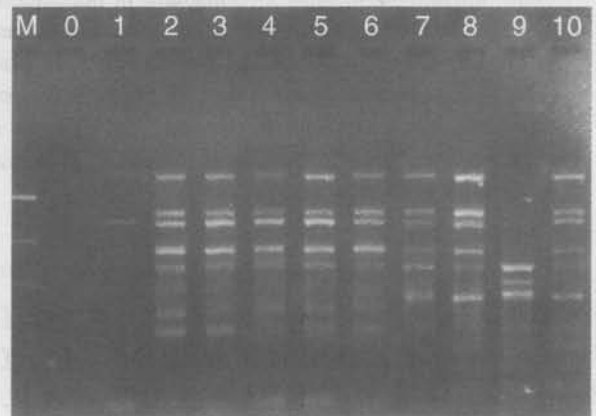
随机扩增多态DNA片段共享度根据Nei和Li(1979)的公式 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ^[6]计算,其中 N_x 和 N_y 分别代表2样本扩增出的DNA总数, N_{xy} 代表2样本共有的DNA片段数,采用Neighbour-Joining法构建树状图进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD分析结果

对50条随机引物进行筛选,其中14条引物的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳得到重复性、稳定性好的谱带(见图1,图版I)。统计表明,14条引物共扩增

出85条DNA带,其中多态性带67条,占总数的78.8%,每个引物扩增的带数为1~9条,平均为5.6条。对于安徽羽叶报春居群,14条引物共扩出62条带,其中多态性带占44条;而毛茛叶报春共扩出63条带,其中多态性带占42条。结果表明,安徽羽叶



1-6: 安徽羽叶报春 *Primula merrilliana* Schltr.;
7-10: 毛茛叶报春 *P. cicutariifolia* Pax; O: 双蒸水 water;
M: DNA标准分子量 λ DNA-Hind III/EcoRI

图1 引物I-02扩增的RAPD产物图谱
Fig. 1 RAPD pattern amplified by primer I-02

报春与毛茛叶报春的遗传多样性水平都比较高,它们的多态位点分别达到了71.6%与66.7%,推测这可能不是导致2物种濒危的主要因素。安徽羽叶报春的遗传多样性略高于毛茛叶报春的遗传多样性,可能是由于前者各居群地理隔离较远,各自适应不同的生境而趋于较高的遗传多样性。后者的各居群,除杭州灵隐寺地理位置较远外,其他的居群只是所处的峡谷与海拔高度不同而已,因此,其遗传多样性略低于安徽羽叶报春的遗传多样性。另外,对于部分引物(如E-14)扩增的谱带非常一致(图版I-B),而部分引物如E-18只有毛茛叶报春能扩增出谱带(图版I-C),说明2物种既有密切的渊源关系,又存在较大的变异,推测它们有一共同的祖先,由于生境的改变而发生基因突变,从而导致遗传特性的改变,进而表现出形态的差异,形成一对亲缘关系非常密切的衍生种。

2.2 遗传距离分析

根据公式 $D = 1 - F^{[7]}$, 计算出安徽羽叶报春和

毛茛叶报春各居群的遗传距离(见表2),其中安徽羽叶报春各居群的平均遗传距离为0.3813,毛茛叶报春各居群的遗传距离为0.3278,这充分反映了遗传距离与居群距离的密切关系。

采用N-J法构建的各居群遗传距离聚类图(图3)显示,毛茛叶报春与安徽羽叶报春是分类学上2个自然的物种^[8]。聚类图还显示安徽羽叶报春居群02和居群03密切而与居群01较远,而毛茛叶报春居群07与居群10密切与居群09相距较远。根据地理分布得知,居群02与居群03分别位于安徽省的郭村乡与贤村乡,虽有各自的小生境,但除海拔和土壤状况有差异外,气候与水分状况变化都不大,而相对居群01而言,其土壤、小气候、水分和光照条件都有变化,因此趋异性更强。同样居群07与居群10同属于黄山山系,而灵隐寺居群09已属于天目山山系,尤其是后者处于典型的石灰岩地貌上,所以导致遗传变异较大。

表2 安徽羽叶报春和毛茛叶报春居群间的遗传距离¹⁾

Table 2 Genetic distance matrix among the populations of *Primula merrilliana* Schltr. and *P. cicutarifolia* Pax¹⁾

居群号 No. of population	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
01	0.000 0									
02	0.514 3	0.000 0								
03	0.500 0	0.175 0	0.000 0							
04	0.323 9	0.439 0	0.341 2	0.000 0						
05	0.473 7	0.358 0	0.390 2	0.280 9	0.000 0					
06	0.662 0	0.201 5	0.284 0	0.441 9	0.352 4	0.000 0				
07	0.753 4	0.594 9	0.590 4	0.659 1	0.558 1	0.626 4	0.000 0			
08	0.753 2	0.624 9	0.627 9	0.644 4	0.608 7	0.632 2	0.304 3	0.000 0		
09	0.811 0	0.726 0	0.766 2	0.785 7	0.638 6	0.756 1	0.427 1	0.482 4	0.000 0	
10	0.756 7	0.611 1	0.666 7	0.666 7	0.605 3	0.636 4	0.128 2	0.261 9	0.368 2	0.000 0

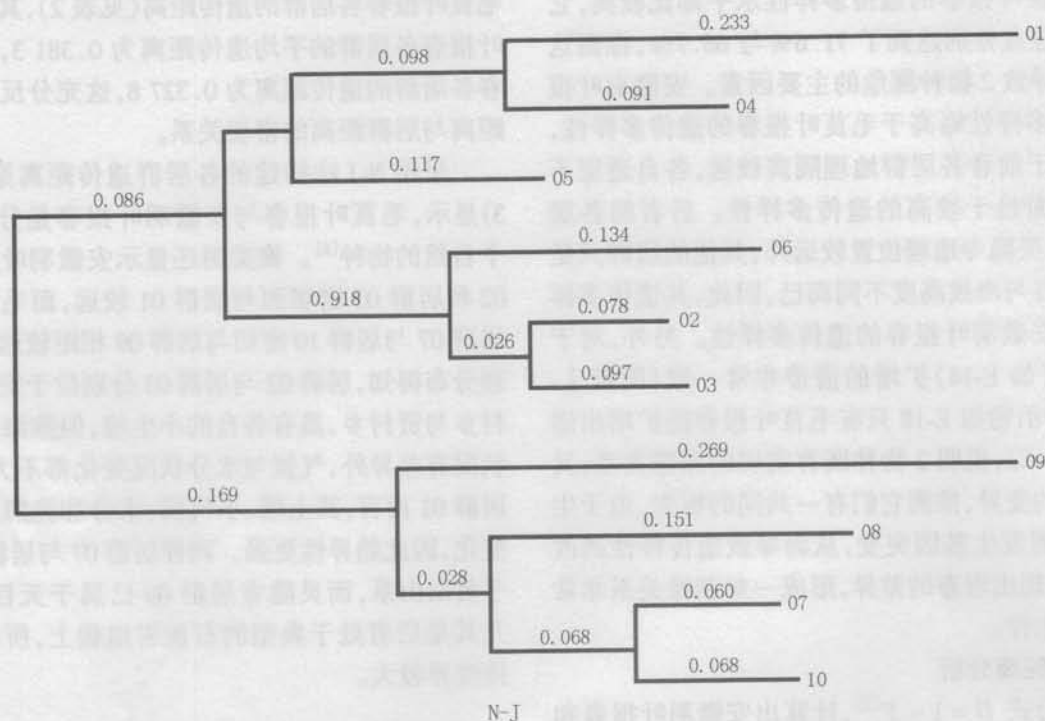
¹⁾ 01-06: 安徽羽叶报春 *Primula merrilliana* Schltr.; 07-10: 毛茛叶报春 *P. cicutarifolia* Pax

3 新资源评估

安徽自然条件优越,尤其是“两山一湖”(黄山、九华山、太平湖)更是名扬天下。安徽羽叶报春与毛茛叶报春正处于该景区内,并且前者只为该地区所特有;其次,这2种植物都是二年生小草本,植株高不过15 cm,叶为羽状叶,娇小玲珑,宜制成案头盆景或置于假山之上,别样生姿。并且元月底即可含苞待放,早早预报春的到来,花色从粉白到紫红,芬芳

淡雅,楚楚依人,其花期可延至6月底、7月初。同时花朵多,1株安徽羽叶报春最多可产花几十朵,是不可多得的观赏花卉新资源;再者,如前文所述,这2种植物的遗传多样性都较高,其遗传多样性的维持与生境多样性密切相关,造成濒危的主要因素可能是人为地破坏了它们所需要的生境,如大面积苔藓的丧失等。为了有效地维持它们较高的遗传多样性,避免近交衰退而导致基因流失,应防止水土流失,做到合理开发与保护^[9]。

综上所述,安徽羽叶报春和毛茛叶报春虽都处



01-06: 安徽羽叶报春 *Primula merrilliana* Schltr.; 07-10: 毛茛叶报春 *P. cicutariifolia* Pax; 分支线上的数据代表分支长度 The data on the line present branch length

图2 根据 RAPD 数据应用 N-J 法构建的安徽羽叶报春和毛茛叶报春遗传树系图

Fig. 2 Genetic dendrogram of populations of *Primula merrilliana* Schltr. and *P. cicutariifolia* Pax using Neighbour-Joining algorithm to cluster RAPD data

于濒危状态,但这2个物种遗传多样性都比较高,根据它们的地理分布优势、自身特点和旅游价值,作为观赏花卉新资源,具有很大的开发前景。

参考文献:

- [1] 安徽植物志协作组. 安徽植物志(第四卷)[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1991.
- [2] 陈明林,张小平,孟凡庭. 皖南奇葩——安徽羽叶报春[J]. 植物杂志,2001,(2):6-7.
- [3] 王诗云,徐惠珠,赵子恩,等. 湖北及其邻近地区珍稀濒危植物保护的研究[J]. 武汉植物学研究,1995,13(14):354-368.
- [4] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志(总论)[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1986.
- [5] David M H, Barbara K M, Elizabeth A Z. Molecular Systematics[M]. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc. 1996.
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [7] 彭建营,束怀瑞,彭士琪. 用 RAPD 技术探讨中国枣的种下划分[J]. 植物分类学报,2002,40(1):89-94.
- [8] 郭新弧. 安徽报春花属 *Primula* L. 植物发现和研究所[J]. 阜阳师范学院学报,1992,18(2):28-29.
- [9] 陈明林,张小平. 珍稀濒危植物安徽羽叶报春的生态学特性研究[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版),2002,25(4):371-374.

图版说明 Explanation of plates

图版 I A: 引物 E-13 的扩增结果; B: 引物 E-14 的扩增结果; C: 引物 E-18 的扩增结果; D: 引物 E-19 的扩增结果; E: 引物 H-01 的扩增结果; F: 引物 H-05 的扩增结果; G: 引物 Q-15 的扩增结果; H: 引物 I-02 的扩增结果; 1-6: 安徽羽叶报春; 7-10: 毛茛叶报春; O: 双蒸水; M: DNA 标准分子量

Plate I A: The results amplified by primer E-13; B: The results amplified by primer E-14; C: The results amplified by primer E-18; D: The results amplified by primer E-19; E: The results amplified by primer H-01; F: The results amplified by primer H-05; G: The results amplified by primer Q-15; H: The results amplified by primer I-02; 1-6: *Primula merrilliana* Schltr.; 7-10: *P. cicutariifolia* Pax; O: water; M: λ DNA-*Hind* III/*Eco*R I.

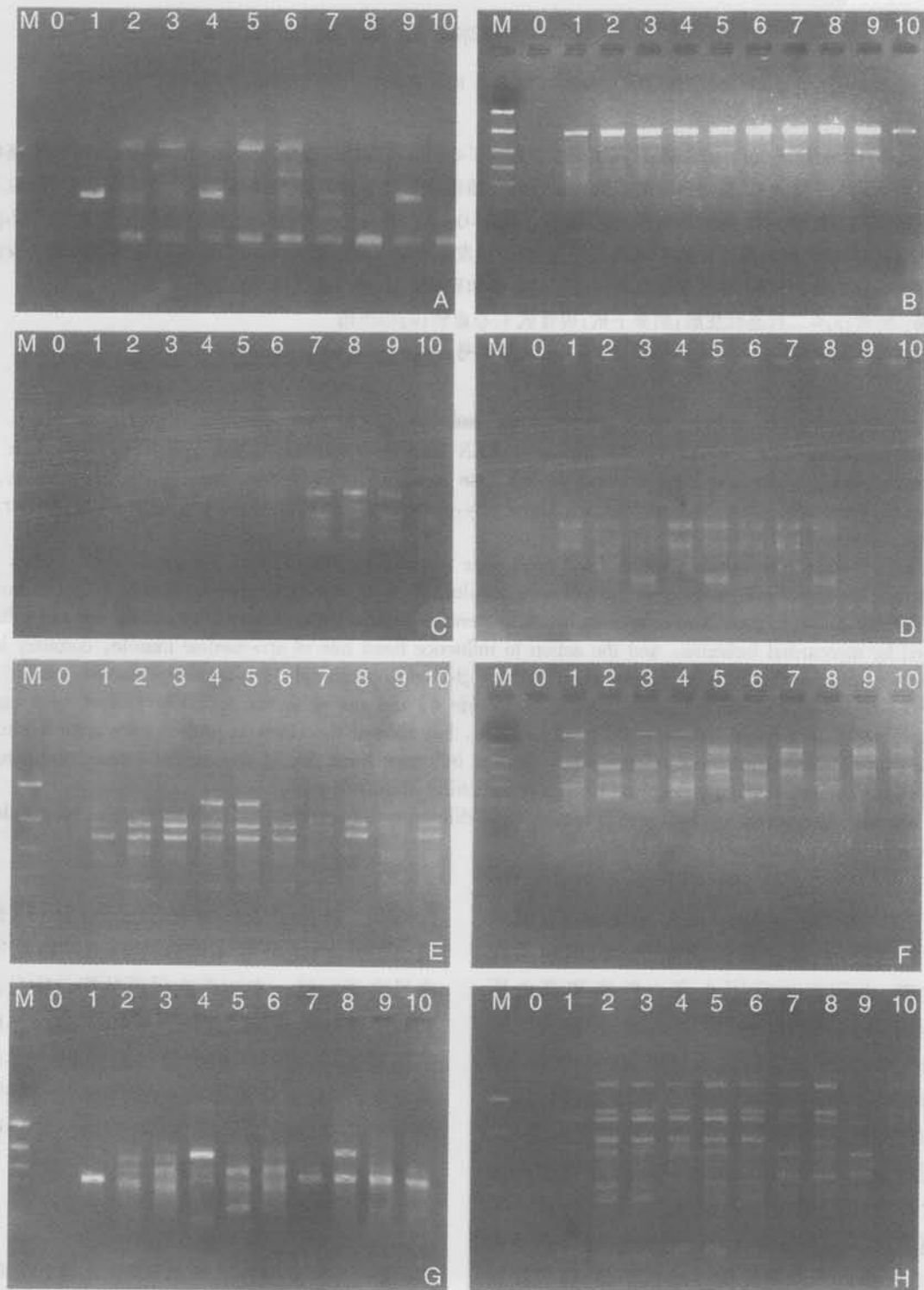
张小平等:安徽羽叶报春与毛茛叶报春的遗传多样性研究与新资源评估

图版 I

Zhang Xiaoping *et al*: A study of genetic diversity of *Primula merrilliana* and

P. cicutariifolia with assessing new ornamental resources

Plate I



See the explanation of the end of text