

• 研究简报 •

濒危植物元宝山冷杉的遗传多样性研究

王 燕¹ 唐绍清^{1*} 李先琨²

¹(广西师范大学生物系, 桂林 541004)

²(广西壮族自治区广西植物研究所, 桂林 541006)
中国科学院

摘要: 元宝山冷杉(*Abies yuanbaoshanensis*)是仅分布于广西融水县元宝山的珍稀濒危物种。本研究采用 AFLP 分子标记分析了元宝山冷杉种群的遗传多样性。取元宝山冷杉种群 43 棵植株作为研究材料, 4 对引物组合用于 AFLP 扩增, 共得到 261 条 DNA 扩增带。分析结果: 元宝山冷杉种群的多态位点百分比率为 50.96%, Nei's 基因多样性为 0.1510, Shannon 多样性指数为 0.1735。用 NTSYS 软件计算各个样品间的相似性系数, 并用 UPGMA 法基于相似性系数进行了聚类分析。研究结果表明: 元宝山冷杉种群的遗传多样性水平低, 种群内个体间的相似性系数很大, 无明显亚种群间的遗传分化。要保护或保存这个物种的遗传资源, 建议应该选择种群内尽可能多的个体进行保护。

关键词: *Abies yuanbaoshanensis*, AFLP, 遗传多样性, 保护

中图分类号: Q16 文献标识码: A 文章编号: 1005-0094(2004)02-0269-05

The genetic diversity of the endangered plant *Abies yuanbaoshanensis*

WANG Yan¹, TANG Shao-Qing¹, LI Xian-Kun²

¹ Department of Biology, Guangxi Normal University, Guilin 541004

² Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006

Abstract: *Abies yuanbaoshanensis* (Pinaceae) is an endangered species endemic to Yuanbaoshan Mountain, Guangxi, China. Genetic diversity in 43 individuals of the species was assessed using the amplified fragment length polymorphisms (AFLP) technique. Four primer combinations generated a total of 261 bands, of which 133 were polymorphic (50.96%). The Nei's gene diversity of the population was 0.1510, and Shannon's information index was 0.1735. The results indicate that *Abies yuanbaoshanensis* has a low level of genetic diversity. This finding provides valuable information for formulating future conservation programs for the species.

Key words: *Abies yuanbaoshanensis*, AFLP, genetic diversity, conservation

元宝山冷杉(*Abies yuanbaoshanensis*)属松科(Pinaceae)冷杉属(*Abies*),为仅产于我国广西北部融水县元宝山的孑遗、濒危植物,是研究我国第四纪冰川时期植物区系和气候变迁的“活化石”,被收录在《中国植物红皮书》(第一卷)中(吕庸浚,傅立国,1992)。元宝山冷杉是国家一级保护植物,并作为全球重点保护的针叶树被列入1998年IUCN拟订的“针叶树行动计划”中(向巧萍,2001)。

由于元宝山冷杉分布范围窄、数量少,其种群所

有个体的总和仅900株左右,种群繁殖力低、幼苗死亡率高,目前该种群已处于极度濒危状态(李先琨,苏宗明,2002)。对于元宝山冷杉已经开展了群落特征、种群结构与动态、濒危原因及结实特性和种子繁殖力等方面的研究(黄仕训等,1996;唐润琴等,2001;李先琨,苏宗明,2002;李先琨等,2002),但迄今对这一重要类群的遗传多样性仍知之甚少。

扩增片段长度多态性(AFLP)是一种高效的分子标记方法(Vos *et al.*, 1995),它既具有RFLP的

准确性,又具有 PCR 的高效性等优点。本研究采用 AFLP 分子标记技术检测了元宝山冷杉种群的遗传多样性,旨在了解元宝山种群的遗传变异水平,从而更清楚地认识元宝山冷杉的生存潜力和濒危程度,为采取有针对性的挽救和保护措施提供科学的依据。

1 材料方法

1.1 取样

元宝山冷杉种群集中分布在元宝山的冷杉坪内,迷路坪、铁杉顶、白石坪等地也有少量分布,分布范围海拔 1700–2050 m。2001 年 6 月底,在 4 个相对独立的小地点选取元宝山冷杉高 2 m 以上的植株,取样个体数量取决于群体规模。取样时个体间距尽可能大,以避免同宗后代。共采集 43 株个体,并依次编号。1—22 号采自厘杉坪,23—25 号采自迷路坪,26—30 号采自铁杉顶,31—43 号采自白石坪。每株取一枝带幼叶的小枝条,插于水中带回实验室,取其幼叶用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取

采用 CTAB 法(Doyle & Doyle, 1987)提取基因组总 DNA,但 65℃ 保温时间延长到 3 h。用玻璃奶纯化总 DNA。

1.3 AFLP 分析

AFLP 分析参照 Vos *et al.* (1995)的方法略有修改。基因组总 DNA 用两种限制性内切酶(*EcoR* I 和 *Mse* I)在 37℃ 保温 2 h,接着在 65℃ 保温 2 h 进行双酶切,限制性酶切消化后,用 T4 DNA 连接酶在 20℃ 保温 16 h 将酶切片段连接到双链 *EcoR* I 和 *Mse* I 接头(Vos *et al.*, 1995)上;连接产物用预扩增引物进行预扩增。预扩增产物稀释 10 倍后,进行选择扩扩增。从 24 对引物组合中筛选出 4 对引物组合:E-ACA/M-CTT, E-AAC/M-CTT, E-AAC/M-CTG, E-ACA/M-CAT 进行正式选择性扩增,其中 *EcoR* I 引物的 5' 端用荧光染料进行标记,扩增时 *EcoR* I 引物和 *Mse* I 引物的最终浓度分别为 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L。选择性 PCR 扩增程序为 94℃ 0.5 min, 65℃ 0.5 min, 72℃ 1 min,以后每个循环退火温度降低 0.7℃,共 13 个循环,接 23 个循环,每个循环 94℃ 0.5 min, 56℃ 0.5 min, 72℃ 1 min。选择性扩增产物在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上,在自动测序仪(ABI 377)上分离检测,得到 AFLP 的 DNA 指

纹图谱。

1.4 数据分析

AFLP 是显性标记,同一对引物的扩增产物中,电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。按照在相同迁移位置上有扩增带记为 1、无带为 0 的方法记录电泳谱带,建立 AFLP 表型数据矩阵用于进一步分析。用 POPGENE 32 (Yeh *et al.*, 1997)软件计算分析多态位点百分比率(*PPL*)、种群基因多样性值(*H*) (Nei, 1973)、Shannon 多样性指数(*I*) (Lewontin, 1972)和亚种群间遗传距离 (Nei, 1972)。用 NTSYS-PC 2.10 (Rohlf, 1994)软件计算样品间的 Nei 和 Li 相似性系数 *S_n* (Nei & Li, 1979)并进行 UPGMA 法聚类分析。

2 结果

2.1 遗传多样性

4 对引物组合:E-ACA/M-CTT, E-AAC/M-CTT, E-AAC/M-CTG, E-ACA/M-CAT 对元宝山冷杉种群内选取的 43 个样品,分别扩增得到 65、69、63 和 64 条清晰的带(共 261 条),分子量在 50 bp 至 500 bp 之间,平均每对引物可扩增出 65.3 个条带。其中 133 条是多态性带,多态位点百分比率(*PPL*) = 50.96。基因多样性值(*H*)为 0.1510,种群的 Shannon 多样性指数(*I*)为 0.1735。以 4 处采样地点作为亚种群进行分析,亚种群间的遗传关系见表 1。4 个亚种群之间的遗传距离很小,在 0.0287 与 0.0635 之间。另外也没有发生带型的固定,即每一种带型都是 4 个采样地点共同具有的。从以上结果可看出,在 4 个亚种群间没有明显的遗传分化。

2.2 样品间的遗传关系

个体间相似性系数越大,遗传(亲缘)关系越近;反之,遗传关系越远。元宝山冷杉种群内抽样的 43 个个体之间的相似性系数值都很大,样品间的 Nei 和 Li 相似性系数在 0.877–0.994 之间,说明它们的遗传相似性程度很高。利用 UPGMA 法对各样品(43 个个体)基于 Nei 和 Li 相似性系数进行聚类分析,得到的树状图见图 1。UPGMA 聚类可将种群内抽样的个体都区分开来,因为个体之间的遗传相似性高,它们没有按亚种群被聚合为 4 群。反映出元宝山冷杉的遗传多样性较低,4 个亚种群间没有明显的遗传分化。