

云南尼泊尔桤木遗传多样性研究

李洁¹, 熊智¹, 张成刚²

(1. 西南林学院 资源学院, 云南 昆明 650224; 2. 中国科学院
沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110015)

摘要: 分别在云南省来凤山、高黎贡山、鸡足山、苍山和无量山, 采集 58 个尼泊尔桤木 *Alnus nepalensis* 叶样品, 提取总 DNA, 对它们进行 RAPD-PCR 分析。3 个随机引物共扫描到 DNA 位点 85 个, 其中多态性位点 64 个, 样品内的多态性为 75.30%; 用非加权组法(UPGMA)聚类分析, 建立尼泊尔桤木分子聚类树状图, 以相似系数 0.68 为标准分为 6 类; 用 POPGENE 软件分析 Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 遗传多样性指数。结果表明: 云南尼泊尔桤木遗传多样性丰富, 其中, 鸡足山尼泊尔桤木居群多样性指数最高, 无量山居群中, 分布在南坡的尼泊尔桤木多样性指数高于分布于北坡的样品。尼泊尔桤木的分布及遗传结构与环境区域有密切的关系, 区域特点是决定尼泊尔桤木遗传多样性水平的重要因子之一。该结果对于研究尼泊尔桤木遗传多样性以及它与共生固氮弗兰克氏菌 *Frankia* 的协同进化有一定的利用价值。图 2 表 2 参 25

关键词: 林木遗传育种学; 尼泊尔桤木; 遗传多样性; 随机扩增多态 DNA (RAPD)

中图分类号: S792.14 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)01-0016-06

Genetic diversity of *Alnus nepalensis* in Yunnan revealed by RAPD-PCR

LI Jie¹, XIONG Zhi¹, ZHANG Cheng-gang²

(1. Resources Faculty, Southwest Forestry College, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Science, Shenyang 110015, Liaoning, China)

Abstract: *Alnus nepalensis* is the oldest species of Betulaceae, mainly distributed in Yunnan Province, which can fix nitrogen. The objective is to study its genetic diversity and assess its resources. In Yunnan Province 58 naturally occurring samples of *A. nepalensis* were collected from Laifeng, Gaoligong, Jizu, Cang, and Wuliang Mountains. The genomic DNA of *A. nepalensis* was as extracted by the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method, and their DNA polymorphism was analyzed by random amplification of polymorphic DNA (RAPD)-polymerase chain reaction (PCR) with 3 optimum primers. A total of 85 DNA bands were amplified, and a DNA molecular UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) dendrogram was established. Also, for the samples, Nei's gene diversity and Shannon's information index were computed by POPGENE software Numerical Taxonomy SYStem (NTSYS) software. Results indicated that 64 of the 85 DNA bands (75.3%) were polymorphic, and with the dendrogram *A. nepalensis* samples were placed into 6 groups with a standard similarity coefficient of 0.68. *A. nepalensis* possessed abundant genetic diversity with the highest diversity found in the Jizu Mountains. In the Wuliang Mountains genetic diversity of *A. nepalensis* was richer along the southern slope than the northern. Also, a close relationship between the genetic structure of *A. nepalensis* and the environment was shown with genetic diversity. [Ch, 2 fig. 2 tab. 25 ref.]

Key words: forest breeding; *Alnus nepalensis*; genetic diversity; random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

收稿日期: 2007-01-05; 修回日期: 2007-04-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划("973"计划)资助项目(001CB1089)

作者简介: 李洁, 硕士研究生, 从事植物生物技术研究。E-mail: lijietaren@163.com。通信作者: 熊智, 副教授, 从事植物生物技术和微生物生态学研究。E-mail: Zhix@swfc.edu.cn

尼泊尔栎木 *Alnus nepalensis* 是桦木科 Betulaceae 栎木属 *Alnus* 的落叶乔木, 在滇中高原、滇西、滇西南、滇中南及东南各地均有分布, 并常常以小片纯林出现, 分布地海拔 1 000 ~ 3 000 m^[1]。它作为固氮放线菌弗兰克氏菌 *Frankia* 的宿主植物之一, 抗逆性强, 生长迅速, 可改善土壤肥力, 促进生态恢复, 其木材用途广泛, 具有重要的生态和经济价值^[2]。栎木属是现存桦木科植物最原始的属, 尼泊尔栎木被认为是该属最原始的种^[3,4]。近年来, 卓仁英等^[5,6]对栎木 *Alnus cremastogyne* 的 DNA 提取及 PCR (polymerase chain reaction) 条件的建立进行了研究, 并对分布在四川不同群体的栎木遗传分化进行了研究。Xie 等^[7]对分布在不列颠哥伦比亚省的红栎木 *Alnus rubra* 遗传结构及资源的管理进行研究后发现, 其遗传分化及聚类结果与地理分布相关联。也有学者利用 18 ~ 28 S rRNA ITS (internally transcribed spacer) 序列分析对栎木属植物的进化进行推测^[8]。但有关尼泊尔栎木的遗传结构研究却鲜有报道。云南被认为是栎木属的起源中心^[3,9], 研究分布在云南的尼泊尔栎木遗传多样性, 有利于对其遗传资源进行评估, 可以为有效利用这一固氮资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及采样地概况

分别在无量山、鸡足山、来凤山、高黎贡山和苍山的不同海拔处采集尼泊尔栎木叶片(表 1)。采集的叶片经表面消毒、干燥后, 在 4 °C 下保存, 备用。

地处滇中南的无量山, 具鲜明的南亚季风气候特点, 干湿季明显, 四季不分明, 兼具低纬度高原气候的特点, 太阳辐射强烈, 热量丰富, 年温差小, 日温差大, 年平均气温为 18.3 °C, 年降水量为 1 095.3 mm^[10]。鸡足山位于滇中高原西北部, 横断山脉东侧, 山体中下部的年平均气温为 11.9 °C, 年降水量 1 192.3 mm, 干湿季分明, 气温及降水垂直变化明显^[11]。来凤山是位于云南西部边陲腾冲县的一座火山^[12]。高黎贡山位于中缅交界地带, 地处横断山区南段, 24°40' ~ 28°30'N, 97°30' ~ 99°00'E, 地势由北向南逐渐降低, 有特殊的地质地貌和多样化的气候条件, 在总体上属于季风气候类型, 生物资源极为丰富^[2]。苍山位于云南西部, 地处滇中高原和横断山区的交界之处, 位于低纬度亚热带地区, 海拔为 2 200 ~ 4 122 m, 年降水量为 1 846.4 mm, 年均温差为 8.4 °C, 地形地貌复杂, 立体气候显著^[13]。这些地方环境差异较大, 气候类型各异, 对大范围的样品进行研究, 有利于认识云南尼泊尔栎木的遗传多样性, 以及其分布与自然环境的关系。

1.2 研究方法

1.2.1 叶片总 DNA 的提取 DNA 提取采用 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)法^[14]。取少量叶片用液氮研磨成粉, 转入 1.5 mL 离心管中, 加入预热的 2 × CTAB 提取液(2.0 g · L⁻¹CTAB, 0.1 mol · L⁻¹Tris (pH 8.0), 0.02 mol · L⁻¹EDTA (pH 8.0), 1.4 mol · L⁻¹NaCl, 20 g · L⁻¹PVP) 1 mL, 于 65 °C 温育 1 h。离心取上清液后, 用等体积酚、氯仿和异戊醇(25:24:1)抽提 2 次。加入 1/10 体积 3 mol · L⁻¹的乙酸钠和 2 倍体积冰乙醇沉淀 DNA。DNA 沉淀用体积分数为 70% 乙醇洗涤 2 ~ 3 次, 用去离子水溶解, 储存在 -20 °C 备用。

1.2.2 RAPD-PCR 扩增 从上海博亚生物技术有限公司合成的 20 个随机引物中, 筛选了 3 个扩增较稳定、多态性较好的引物, 其 Operon 编号分别为 AG-01 (5'-CTACGGCTTC-3'), AG-02 (5'-CTGAGGTCCT-3') 和 AG-04 (5'-GGAGCGTACT-3')。PCR 扩增反应总体积为 20 μL, DNA 模板约 10 ng, 4 mmol · L⁻¹Mg²⁺, 0.2 mmol · L⁻¹dNTP, 1 μmol · L⁻¹引物, 10 × PCR buffer 2 μL, 4.17 nkat *Taq* DNA 聚合酶(北京华美公司产品)。扩增反应在 Biometra 梯度 PCR 仪上进行, 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 33 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 循环 45 次, 最后在 72 °C 终延伸 10 min。

1.2.3 电泳图谱分析 PCR 产物用 12 g · L⁻¹的琼脂糖凝胶电泳检测。胶片用 Labworks 4.6.00.0 凝胶成像系统拍照, 判读各条带的分子量, 并转化为二元性状编码矩阵。用 NTSYSpc version 2.11a 软件, 采用 SM 系数(simple matching coefficient)计算各样品带型的距离矩阵, 并用非加权配对算术平均法(unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA)构建聚类树状图。利用 POPGENE 3.2 软件计算 Nei's 遗传多样性(h)^[15]以及 Shannon 遗传多样性指数(I)^[16]。

表1 用于分析的尼泊尔桫欏木叶样品

Table 1 Leaf samples and their locations

样号	海拔/m	坡向	坡度/(°)	样号	海拔/m	坡向	坡度/(°)	样号	海拔/m	坡向	坡度/(°)
LFS1	1 700	S	8	GLGS13	1 930	NE10°	45	JZS6	2 660	NW20°	25
LFS2	1 710	S	8	GLGS14	1 990	NE12°	35	JZS7	2 550	NW15°	20
LFS3	1 800	N	12	GLGS15	2 050	NW20°	35	JZS8	2 620	NW18°	20
LFS4	1 850	S	20	GLGS16	1 510	NW10°	20	JZS9	2 350	NE21°	30
LFS5	1 850	NE16°	25	GLGS17	1 510	NW12°	20	JZS10	2 160	NE2°	30
LFS6	1 900	NE16°	25	GLGS18	1 310	NW10°	10	JZS11	2 160	NE2°	30
LFS7	1 900	NE26°	25	GLGS19	2 020	NE12°	5	WLS1	2 240	NE12°	40
LFS8	1 900	NE26°	25	GLGS20	2 010	NE7°	10	WLS2	2 190	NE27°	10
GLGS1	1 880	NW11°	25	GLGS21	2 400	NE31°	20	WLS3	2 200	S	10
GLGS2	2 010	NW14°	30	CS1	2 450	NE30°	40	WLS4	2 210	S	10
GLGS3	1 580	NE19°	25	CS2	2 450	NE32°	40	WLS5	2 200	NW15°	30
GLGS4	1 990	NW7°	30	CS3	2 150	NE30°	30	WLS6	2 230	NE18°	40
GLGS5	1 990	NW7°	30	CS4	2 200	NW22°	40	WLS7	2 240	NE18°	40
GLGS6	2 000	NW6°	30	CS5	2 250	NE22°	35	WLS8	2 260	NE18°	40
GLGS7	2 020	NW11°	30	CS6	1 900	NE23°	20	WLS9	2 360	S	30
GLGS8	1 890	NE8°	30	JZS1	2 400	NE27°	10	WLS10	2 400	S	30
GLGS9	1 870	NE8°	30	JZS2	2 400	NW14°	20	WLS11	2 420	S	30
GLGS10	1 870	NE8°	30	JZS3	2 400	NW19°	40	WLS12	2 455	S	30
GLGS11	1 910	NE10°	35	JZS4	2 690	NW16°	25				
GLGS12	1 900	NE10°	35	JZS5	2 630	NW15°	20				

说明: LFS1 ~ LFS8 代表来凤山样品, GLGS1 ~ GLGS21 代表高黎贡山样品, CS1 ~ CS6 代表苍山样品, JZS1 ~ JZS11 代表鸡足山样品, WLS1 ~ WLS12 代表无量山样品; N, S, NE, NW 分别代表北坡、南坡、北偏东、北偏西。

2 结果与分析

2.1 扩增结果检测

利用筛选出的3个随机引物对尼泊尔桫欏木样品DNA进行扩增,得到了重复性较好,稳定清晰的扩增结果,且扫描的片段大小范围为100~2 000 bp(图1)。用这3个随机引物共扫描到DNA位点85个,其中多态性位点64个,即存在于这些样品内的多态性为75.30%。在高等植物中这是一个较高的多态性水平,也就是说该类群遗传变异水平较高,这与样品分布的环境多样性以及其作为起源地的原始种地位是密切相关的。

2.2 聚类分析

从聚类分析树状图(图2)可以看出,所有的样品在60%相似性水平上相聚。用相似性68%作为界定线,在此相似性上所有样品分为6组。其中第Ⅲ组仅有来凤山的1个样品,这可能与来凤山是火山环境的特殊性有关。高黎贡山有48%的样品属于第Ⅱ组,而且这组全为高黎贡山样品,说明该类群可能是高黎贡山的优势类型,这种类型的出现可能与高黎贡山某些独特的环境因子有关。第Ⅴ组中除样品JZS2外全为无量山的样品,而这部分无量山样品占有75%的比例,这可能是该区域的特征遗

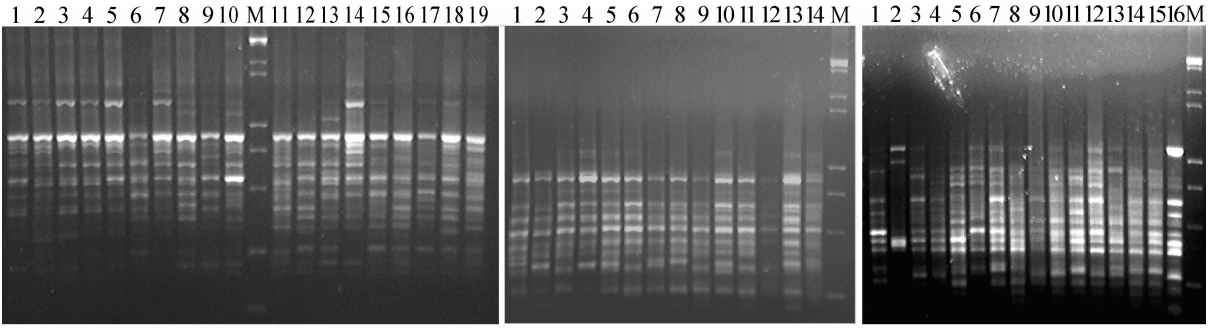


图1 尼泊尔栎木 RAPD 指纹图谱

左图：用引物 AG-1 扩增的高黎贡山尼泊尔栎木 RAPD 指纹图谱。中图：用引物 AG-2 扩增的高黎贡山尼泊尔栎木 RAPD 指纹图谱。右图：用引物 AG-3 扩增的苍山(1~4)和鸡足山(5~16)尼泊尔栎木 RAPD 指纹图谱。M：宽范围的 DNA 分子标记(250 ~ 15 000 bp) (宝生物)

Figure 1 RAPD fingerprint patterns of *Alnus nepalensis*

left: RAPD fingerprint patterns of *A. nepalensis* from Gaoligong Mountain with primer AG-1; medium: RAPD fingerprint patterns of *A. nepalensis* from the Gaoligong Mountain with primer AG-2; right: the RAPD fingerprint patterns of the samples from the Cang Mountain (lane 1-4) and from the Jizu Mountain (Lane 5-16) with primer AG-4; M: wide range DNA marker (250-15000 bp) (TaKaRa Co.)

传类型。第VI组是仅苍山和鸡足山共有的，这可能与二者的地理位置有关，它们是距离较近的2座山，同属于一个大的区域；第VI组又在72%的相似性上形成了3个分支，其中有2支分别为各自独有的，一支存在交叉，这又可能与各自的小环境存在差异有关。6个组中仅I和IV包含了不同地方的样品，它们可能是各地区样品共有的类型。

2.3 尼泊尔栎木各居群之间多样性比较

Nei's 和 Shannon 遗传多样性指数是进行居群遗传变异量度的指标，它们的计算结果不受各居群样品数目的影响^[17]。多样性指数的计算和比较(表2)表明，分布在鸡足山的尼泊尔栎木遗传多样性水平最高，其次是高黎贡山和无量山、来凤山居群，苍山居群的遗传多样性水平最低。鸡足山地处云南干热河谷的宾川地区，属低纬度高原季风气候，气温和降水垂直变化明显，这些相对胁迫压力较大的因子可能是鸡足山尼泊尔栎木居群具有较高水平遗传变异的重要原因^[18]。除了复杂多样的环境因素，进化时期，林地演替的阶段，原始祖先种基因差异，以及人为因素都可能是造成各居群尼泊尔栎木多样性水平差异的原因^[19]。

表2 尼泊尔栎木各居群遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of *Alnus nepalensis* population

居群	样本数	多态性/%	Nei's 遗传多样性指数	Shannon 遗传多样性指数
来凤山	8	67.06	0.2109	0.3247
高黎贡山	21	71.76	0.2289	0.3489
苍山	6	57.65	0.2103	0.3220
鸡足山	11	77.65	0.2591	0.3929
无量山	12	71.76	0.2276	0.3472
合计	58	75.30	0.2800	0.4357

2.4 不同坡向尼泊尔栎木多样性比较

无量山样品分别有南坡和北坡的代表，对分布在无量山不同坡向的尼泊尔栎木遗传多样性分析发现，北坡6个样品分属2组，Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 遗传多样性指数分别为0.1984和0.3031；而南坡6个样品分属3组，多样性指数分别为0.2167和0.3254。很明显，分布在无量山

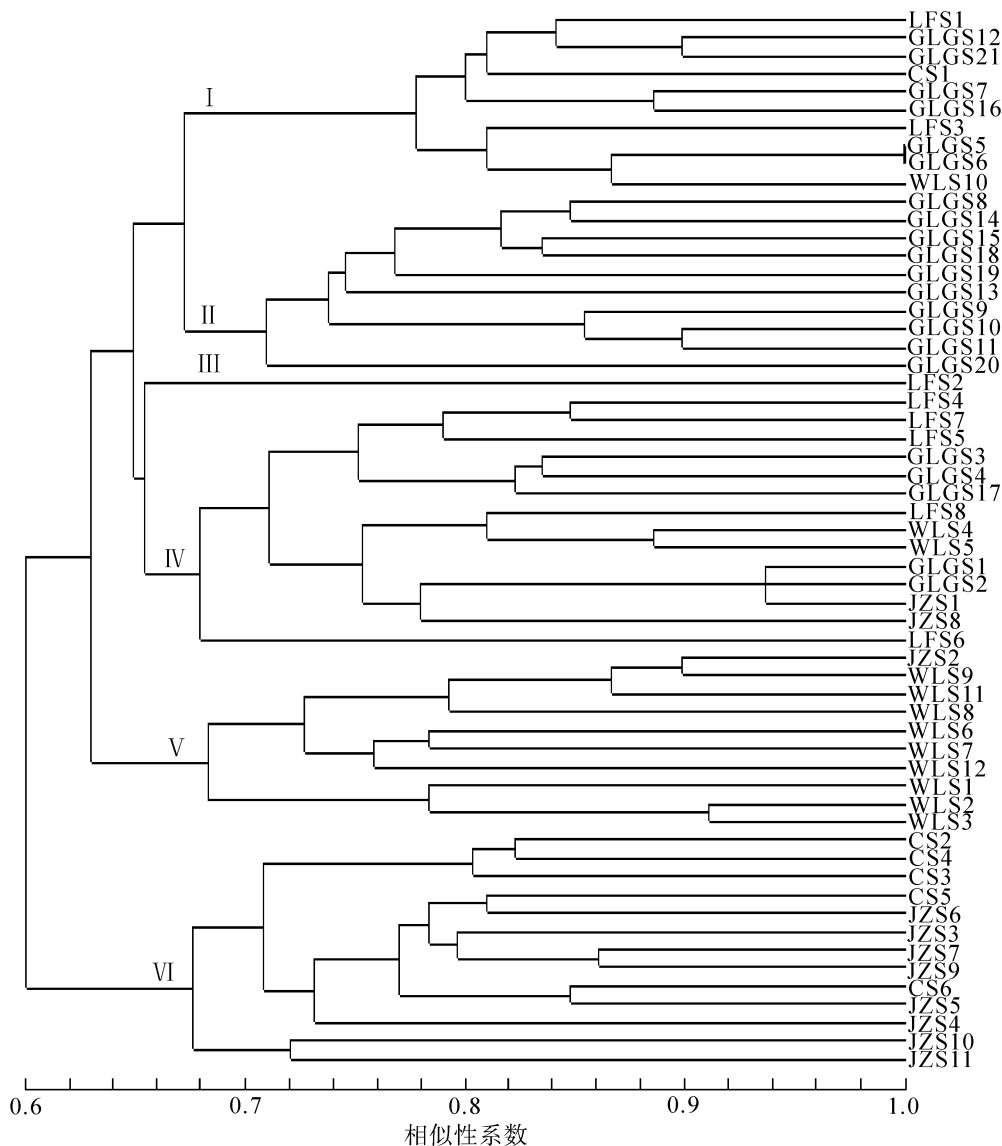


图2 根据尼泊尔桤木 RAPD 指纹图谱构建的 UPGMA 树状图

Figure 2 UPGMA Dendrogram based on simple matching coefficient derived from RAPD-PCR fingerprint patterns of *Alnus nepalensis*

南坡的尼泊尔桤木遗传变异更丰富。这种不同坡向多样性水平的差异,在一定程度上揭示自然环境压力大小与多样性丰富程度之间存在关系。

3 讨论

桤木属植物起源和分化较早,在长期的进化过程中会遇到选择压力,适宜的基因就保留下来,积累了较多的基因,形成了较广的遗传基础,因此,桤木属植物种内存在丰富的遗传多样性^[20]。尼泊尔桤木是桤木属原始的种,属于典型的喜马拉雅植物区系成分,且云南可能是其起源地和现存的分布中心^[3,21],因此,分布在云南的尼泊尔桤木表现了丰富的遗传多样性。桤木属以其高水平 DNA 变异适应地域和环境变化,故分布广,适应性强^[22]。

国内外学者对桤木属植物的研究都表明,不同基因类群的分布与环境区域有密切的关系^[6,7]。本文则对多样点的大量样品进行了分析,较为全面地反映了云南尼泊尔桤木遗传多样性水平及分布情况。通过聚类分析发现,各不同区域均有其特有的优势类群;对相似度数值的比较也发现,各区域内个体间遗传变异程度总体上小于不同区域个体间的变异程度。这表明差异性的环境因子在尼泊尔桤木

长期进化过程中的重要地位。而一些交叉共有的组,可以认为是生态适应性更广的类群,就可能是选择造林树种时应该关注的对象。同时尼泊尔栎木遗传多样性与地域、坡向等因子的关系,符合遗传变异与自然环境胁迫正相关的理论^[23]。

Benson 等人^[24]研究认为弗兰克氏菌 *Frankia* 与宿主植物的共生存在一定的偏好性。也有学者在研究中提到弗兰克氏菌与宿主植物存在共进化,而这种共进化可能意味着它们之间存在基因对基因的关系^[25]。文中针对弗兰克氏菌对应宿主植物的遗传结构进行了探讨,为二者协同进化的研究带来一定的启发。

参考文献:

- [1] 吴征镒, 朱彦丞. 云南植被[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 385.
- [2] 李恒, 郭辉军, 刀志灵. 高黎贡山植物[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 1-5, 369-370.
- [3] 陈之端. 桦木科植物的系统发育和地理分布(续)[J]. 植物分类学报, 1994, **32** (2): 101-153.
- [4] 葛锦芳. 云南桦木科植物的分类与地理分布[J]. 西南林学院学报, 1985, **5** (1): 1-9.
- [5] 卓仁英, 孟现东, 陈益泰. 栎木群体遗传分化研究[J]. 林业科学研究, 2003, **16** (1): 117-122.
- [6] 卓仁英, 陈益泰. 四川栎木不同群体间遗传分化研究[J]. 浙江林业科技, 2005, **25** (1): 13-16.
- [7] XIE C Y, EL-KASSABY Y A, YING C C. Genetics of red alder (*Alnus Rubra* Bong.) populations in British Columbia and its implications for gene resources management [J]. *New For*, 2002, **24** (2): 97-112.
- [8] NAVANRRD E, BOUSQUET J, MIROUD A, et al. Molecular phylogeny of *Alnus* (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences [J]. *Plant and Soil*, 2003, **254** (1): 207-217.
- [9] 陈之端. 桦木科植物的起源和散布[M]//路安民. 种子植物科属地理. 北京: 科学出版社, 1999: 236-258.
- [10] 彭华. 无量山种子植物区系的特有现象[J]. 云南植物研究, 1997, **19** (1): 1-14.
- [11] 彭明春, 党承林. 云南鸡足山元江栲群落和高山栲群落的群落多样性研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1999, **21** (2): 156-159.
- [12] 李春光, 王琼伟, 邵德晟, 等. 腾冲火山区的形变特征[J]. 地震研究, 2000, **23** (2): 165-171.
- [13] 董晓东, 栾晓峰, 李继红, 等. 苍山蕨类植物区系的初步研究[J]. 生态科学, 1998, **17** (1): 52-55.
- [14] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 9-29, 190.
- [15] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1973, **70**: 3 321-3 323.
- [16] LEWONTIN R C. The apportionment of human diversity [J]. *Evolut Biol*, 1972, **6**: 381-398.
- [17] 钱韦, 葛颂. 居群遗传结构研究中显性标记数据分析方法初探[J]. 遗传学报, 2001, **28** (3): 244-255.
- [18] EVIATAR N. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, **98** (11): 6 233-6 240.
- [19] 李俊清, 李景文, 崔国发. 保护生物学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002: 32-50.
- [20] CHEN Z, MANCHESTER S R, SUN H. Phylogeny and evolution of the Betulaceae inferred from DNA sequences, morphology, and paleobotany [J]. *Am J Bot*, 1999, **86** (8): 1 168-1 181.
- [21] 薛纪如, 姜汉桥. 云南森林[M]. 北京: 中国林业出版社, 1986: 230-234.
- [22] SCHWENCKE J, CARU M. Advances in actinorhizal symbiosis; Host plant-*Frankia* interactions, biology, and application in arid land reclamation A review [J]. *Arid Land Res Manage*, 2001, **15** (4): 285-327.
- [23] 唐晓萌, 代玉梅, 熊智, 等. 自然环境胁迫对旱冬瓜 *Frankia* 菌基因多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2003, **14** (10): 1 743-1 746.
- [24] BENSON D R, CLAWSON M L. Evolution of the actinorhizal plant symbiosis [M]// TRIPLETT E W. *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of Biological Process*. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000: 207-224.
- [25] VARGHESE R, CHAUHAN V S, MISRA A K. Evolutionary implications of nucleotide sequence relatedness between *Alnus nepalensis* and *Alnus glutinosa* and also between corresponding *Frankia* microsymbionts [J]. *Plant and Soil*, 2003, **254** (1): 219-227.