

濒危物种山红树居群遗传结构的 RAPD 分析*

苏志龙^{1,3}, 殷寿华^{1**}, 吴成军², 程在全²

(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐仑 666303; 2 云南省农业科学院生物技术研究所, 云南 昆明 650223; 3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用 RAPD 分子标记检测了云南省 3 个山红树居群的遗传多样性和居群遗传结构。10 个引物共检测到 54 个位点, 其中多态位点 11 个, 占 20.37%。与其他的濒危物种相比, 山红树居群内的遗传多样性很低, 居群间的遗传分化很大 (78.65%)。大量经济植物的种植加上人为的破坏, 使山红树的生境遭到严重破坏, 数量大为减少, 可能导致了山红树遗传多样性的丧失、居群间较高的遗传分化。基于以上结果, 探讨了山红树进一步的迁地保护措施。

关键词: 山红树; 遗传多样性; 迁地保护; 居群遗传结构; RAPD

中图分类号: Q 943 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2005)02-0181-06

Analysis of Genetic Structure of the Endangered Species *Pellacalyx yunnanensis* (Rhizophoraceae) by RAPD

SU Zhi-Long^{1,3}, YIN Shou-Hua^{1**}, WU Cheng-Jun², CHENG Zai-Quan²

(1 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Menglun 666303, China;

2 Biotechnology Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650223, China;

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The genetic diversity and population genetic structure of three populations of *Pellacalyx yunnanensis* in Yunnan Province were estimated by RAPD markers. Fifty-four loci were amplified with 10 oligonucleotide primers, of which 11 loci (20.37%) were polymorphic. The genetic diversity within a population was very low, while the genetic differentiation very high (78.65%) among populations compared with other endangered species. The habitat of *P. yunnanensis* was severely destroyed by the people's activities and the economic plants planted, which may result in the loss of genetic diversity and high genetic differentiation. Implications for the further conservation strategies of this endangered species were discussed based on these results.

Key words: *Pellacalyx yunnanensis*; Genetic diversity; *Ex-situ* conservation; Population genetic structure; RAPD

在中国, 红树科 (Rhizophoraceae) 有 6 个属, 包括 13 个种和一个变种。山红树属于红树科

* 基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向性项目 KSCX2-SW-117

** 通讯作者: 殷寿华, E-mail: ysh@xtbg.org.cn, 电话: 0691-8716379

收稿日期: 2004-08-14, 2004-12-03 接受发表

作者简介: 苏志龙 (1978-) 男, 在读硕士, 主要从事保护生物学研究。

的山红树属 (*Pellacalyx*), 是中国的一个特有物种, 生长在海拔 800 m 左右阴暗潮湿的密林中, 在云南省勐腊县有分布 (马信祥等, 1988; 吴征镒, 1984)。根据叶绿体基因 *matK* 序列和核糖体 *rDNA* 序列分析表明, 山红树与竹节树属 (*Carallia*) 植物亲缘关系比较近 (Shi 等, 2002)。

近年来, 由于其生境遭到严重破坏, 山红树的数量及分布区域迅速减少, 已经被列为国家级保护植物 (宋朝枢等, 1989)。从 1985 年开始, 中国科学院西双版纳热带植物园 (XTBG) 开始对山红树实施迁地保护。目前在迁地保护区内有 29 株山红树, 长势良好。野外的山红树分布比较零散, 个别地区只有几株甚至单株存在, 很多分布区域由于过度的砍伐, 如勐仑的大卡箐沟林, 补蚌镇的景飘寨子, 景洪的纳版寨子, 现已找不到活株, 仅在补蚌发现有二个小的山红树居群, 现已得到就地保护。根据 IUCN (国际自然与自然资源保护联合会) 公布的“2001 IUCN 红皮书等级及其标准系统”, 如果一个物种的种群内成熟个体数量少于 250, 则属于濒危物种。根据样地的记录以及野外调查, 山红树的植株总数估计不会高于 250, 属于濒危物种。但迄今为止, 尚未见有报道从遗传多样性与居群遗传结构上探讨山红树的濒危原因。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 方法是 William (1990) 和 Welsh (1990) 各自独立发现的, RAPD 具有操作技术简单易行, 花费较少, 无需了解研究物种的遗传背景等优点, 在濒危物种居群遗传结构的研究中已被广泛采用, 其结果包含很多的保护信息 (Li 等, 2002; Maki and Horie, 1999; Torres 等, 2003; Jover 等, 2003; Kingston 等, 2004; 李鹏等, 2004)。

在本研究中, 我们采用 RAPD 方法检测了山红树两个自然居群和一个迁地保护区居群的遗传多样性, 目的是比较山红树迁地保护区居群与自然居群遗传上的差异, 了解迁地保护区居群的遗传多样性大小, 并提出对山红树进行进一步迁地保护的措施。

1 材料与方法

1.1 植物材料

研究材料采自云南省西双版纳州勐腊县。由于山红树被破坏比较严重, 山红树曾经分布的区域只剩下 2 个地区的 3 个居群, 只采集到了 33 个个体 (表 1)。其中, 21 株采自西双版纳热带植物园的迁地保护区居群, 7 株采自版纳青梅林居群, 5 株采自补蚌林居群。采取单株采样的方法, 每个个体看成一个样品, 采集到的新鲜叶片用随身带的活性变色硅胶快速干燥, 回实验室后放在 -20°C 保存备用。

1.2 DNA 提取及 RAPD-PCR

山红树总 DNA 的提取采用改进的 SDS 法 (程度等, 2002)。提取的 DNA 均用 RNA 酶纯化, 并用紫外分光光度计 (DU640) 在 260 nm 和 280 nm 下测定 OD 值, 确定 DNA 的纯度和浓度, 稀释到约 $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ 作为 PCR 扩增的模板。

表 1 样品的数量及采集地情况

Table 1 Numbers and origin of samples studied

Population	Abbreviation	No. of samples	Sampling site
XTBG <i>ex-situ</i> conservation	EX	21	Mengla county, Yunnan province E101°16'160" N21°55'179" 567 m Alt.
Qingmei forest	QM	7	Mengla county, Yunnan province E101°35'073" N21°36'160" 630 m Alt.
Bubeng forest	BB	5	Mengla county, Yunnan province E101°35'112" N21°34'038" 680 m Alt.

表 2 筛选的引物及其序列

Table 2 Primers selected and their sequences

Primer ID	Company	Sequence
P1	Operon	AGGACTGCTC
P9	Operon	GACGGATCAG
P10	Operon	CACACTCCAG
P15	Operon	TCACCAGCCA
P17	Operon	CTGGCGTGGA
P18	Operon	GAGGTCCACA
R6	Sangon	ACACCCACACA
R12	Sangon	CCTTGACGCA
R17	Sangon	GTGGAGTCAG
R18	Sangon	TGAGGCTCCC

RAPD-PCR 扩增程序参照周涵韬等 (2001) 的方法, 并对实验条件进行适当的优化。PCR 反应总体积为 25 μ l 反应体系, 每个体系包括 50 ng 模板 DNA, 65 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 15 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mmol/L 引物, 1 单位的 Taq 酶。

筛选的引物 42 个来自 Operon 公司, 41 个来自 Sangon 公司。83 个引物中筛选出扩增条带清晰、重复性良好的 10 个引物。

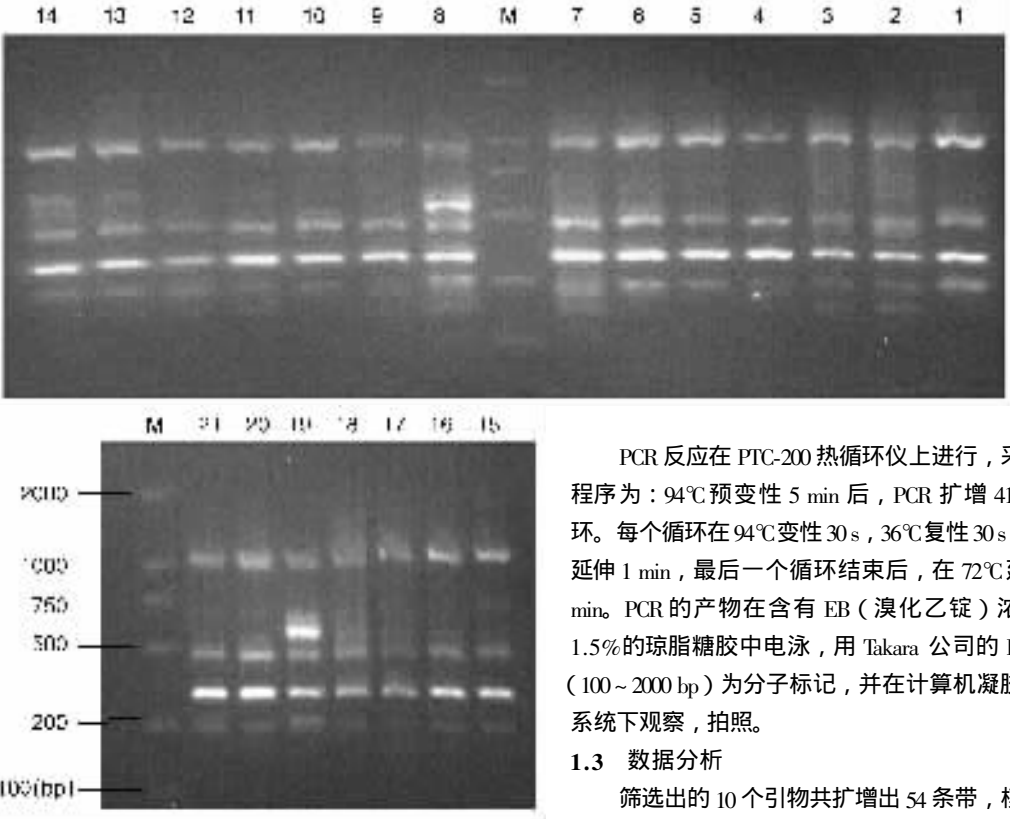


图 1 引物 12 扩增的山红树迁地保护区居群的片段图谱
Fig. 1 The fragments pattern of *P. yunnanensis ex situ* population generated with primer R12

PCR 反应在 PTC-200 热循环仪上进行, 采用的程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, PCR 扩增 41 个循环。每个循环在 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 36 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 最后一个循环结束后, 在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 的产物在含有 EB (溴化乙锭) 浓度为 1.5% 的琼脂糖胶中电泳, 用 Takara 公司的 DL2000 (100~2000 bp) 为分子标记, 并在计算机凝胶成像系统下观察, 拍照。

1.3 数据分析

筛选出的 10 个引物共扩增出 54 条带, 模糊带及弱带不计, 每条带大小范围为 200~1900 bp, 用“1”或“0”表示条带的有或无。得到的数据利用 AMOVA (1.55 版)、EXCEL、NISYS 等软件计算山红树居群内与居群间的遗传多样性与遗传变异。

表 3 山红树遗传多样性

Table 3 The genetic diversity of <i>P. yunnanensis</i>		
Population	No. of polymorphic bands	PPB (%)
<i>Ex-situ</i>	5	9.26
Qingmei Forest	3	5.56
Bubeng Forest	1	1.85
Total	11	20.37

2 结果

10 个引物扩增出的 54 条带中, 多态性条带 11 条, 多态位点的比率为 PPB = 20.37%。*Ex situ* 居群扩增出 52 条带, PPB = 9.26%, 在 3 个居群中具有最高的遗传多样性; QM 居群扩增出 50 条带, PPB = 5.56%; BB 居群扩增出 47 条带, PPB = 1.85%, 在 3 个居群中的遗传多样性最低。

山红树的 3 个居群来自 2 个地区 (补蚌镇和西双版纳热带植物园), 利用 AMOVA 计算山红树居群内与居群间的遗传变异。结果显示有 21.35% 的遗传变异来自居群内, 78.65% 的遗传变异来自居群间 (表 4)。

表 4 山红树 2 个地区 3 个居群的 AMOVA 分析

Table 4 Analysis of molecular variance(AMOVA) for three populations of *P. yunnanensis* from two regions

Source of variation	Variance component	Total variance (%)	P-value
Nested Analysis			
Variance among groups	2.02466213150	(79.63)	< 0.001
Variance among populations within groups	0.02780952381	(1.09)	< 0.001
Variance within populations	0.49015873016	(19.28)	< 0.001
Analysis Among Populations			
Variance among populations	1.80556163930	(78.65)	< 0.001
Variance within populations	0.49015873016	(21.35)	< 0.001
Analysis Among Groups			
Variance among groups	2.04536976080	(80.50)	< 0.001
Variance within groups	0.49539170507	(19.50)	< 0.001

33 个个体用 NTSYS 进行聚类分析 (UPGMA)，聚类图清楚地显示所有个体分成 2 个类群，其中一个类群包括 *Ex situ* 居群的个体，另一个包括 2 个野外居群的个体 (图 2)。

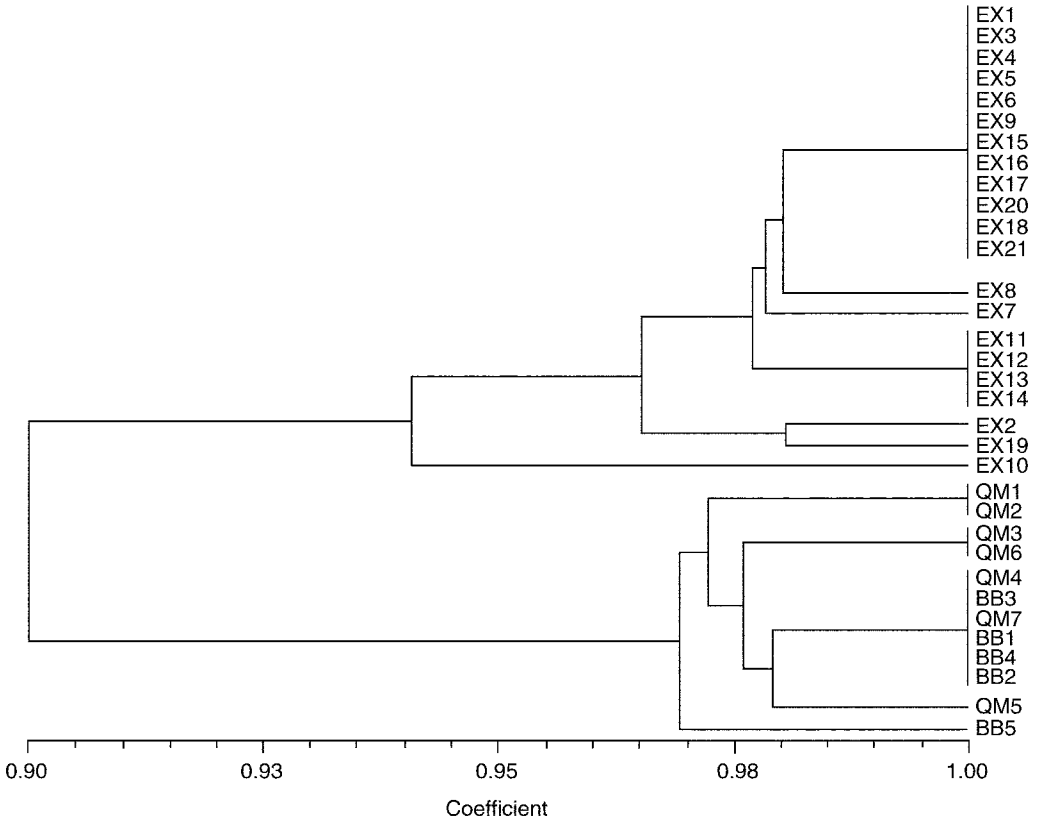


图 2 山红树个体聚类图

Fig. 2 The individuals clustered with UPGMA

3 讨论

研究结果显示，山红树的遗传多样性较低，其多态位点百分率 $PPB = 20.37\%$ ，迁地保护区居群与自然居群的遗传分化较大 (78.65%)。李晓东等 (2003) 用 RAPD 对水杉

(*Metasequoia glyptostroboides*) 8 个居群的遗传多样性进行了研究, 居群平均多态位点百分率为 38.6%; Li 等 (2002) 对版纳青梅 (*Vatica guangxiensis*) 进行了 RAPD 多态性分析, 发现其多肽位点所占比例 (PPB) 为 53.68%, 居群间的遗传变异占 44.91% (AMOVA); 韩春艳等 (2004) 用 RAPD 分析了三棱栎 (*Trigonobalanus doichangensis*) 5 个居群的遗传多样性, 检测到的 157 个位点中, 多态性位点有 83 个, 占 52.87%。同其他濒危物种相比, 山红树的遗传多样性很低。

极低的遗传多样性与高度的遗传分化可能与生境的严重片段化以及本身的生长特性有关。近几年, 大量经济植物的种植, 山红树遭到了破坏性的砍伐, 许多地区已找不到活株存在, 而由经济植物取而代之, 例如, 大卡箐沟林的山红树林现已变成橡胶树林, 景飘寨子的山红树也已被砂仁所取代。山红树在人为的破坏中经历了严重的瓶颈效应, 居群的大量减少及各居群间相互孤立, 个体数量稀少的居群内容易发生近交, 增加纯合度, 造成居群内的遗传多样性的减少和居群内的较高的遗传分化。影响山红树遗传多样性的另一个原因是自身的因素。马信祥等 (1988) 研究了山红树种子的萌发特性, 认为其濒危的原因除了人为因素外, 也有自身的因素, 山红树的种子是在 11 ~ 12 月份成熟, 此时正是干季, 而山红树的种子寿命较短, 在雨季来到之前种子已经不具有萌发活性, 由此导致了山红树的减少。

较低的遗传多样性和较高的遗传分化, 可能会导致该物种的生存力下降与对外界环境的适应能力的降低 (Kjoer 等, 1998; Webstemeier 等, 1998)。迁地保护区内保护的濒危物种的数量有限, 个体间近交的机会大大增加, 也可能造成该物种的遗传多样性丧失, 因此, 尽量多的收集濒危物种的个体到迁地保护区及与其他居群相互杂交, 可有效减少遗传多样性丧失和近交衰退 (Frankham 等, 2002)。

准确的遗传结构信息有利于对濒危物种进一步的迁地保护适当的补充采样措施 (恽悦等, 1998; Kikuchi & Isagi, 2002; Allphin 等, 1998; Castilla 等, 1998; Jover 等, 2003)。对于迁地保护来讲, 保存一个物种所有的遗传变异不现实也是没有必要的 (Brown and Briggs, 1991), Marshall and Brown (1975) 建议, 保存物种 95% 以上遗传变异的居群应优先给予保护。对于山红树居群来讲, 迁地保护区居群保存了 96.3% 的遗传变异, 应优先对其进行保护。

迁地保护区居群与野外自然居群在遗传上存在较大的差异, 应采集更多的个体补充到迁地保护区以保存更多的遗传变异。RAPD 结果显示, 在野外自然居群中有 4 个个体 (QM3, QM5, QM6, BB5) 检测到了特异性的条带, 因此, 这 4 个个体应优先采集。

致谢 感谢本园陶国达教授、王洪教授、兰芹英老师、何惠英老师在采样过程中的指点和帮助。在实验过程中, 李巧明博士、李捷博士给予了分析与启发; 罗银铃、刘冬梅、云南大学的何玉华、阮元元、刘仕平、郭仕平给予了帮助。

〔参 考 文 献〕

- 宋朝枢, 许荣章, 张清华, 1989. 中国珍稀濒危保护植物 [M]. 北京: 中国林业出版社, 331—334
- 吴征镒, 1984. 云南种子植物名录 [M]. 云南: 云南人民出版社, 393
- Allphin L, Windham MD, Harper KT, 1998. Genetic diversity and gene flow in the endangered dwarf bear poppy, *Arctomecon humilis* (Papaveraceae) [J]. *Amer J Bot*, 85 (9): 1251—1261

- Brown AHD, Briggs JD, 1991. Sampling strategies for genetic variation in *ex-situ* collection of endangered plant species [A]. In : Falk D. A., Holsinger K. E. (Eds.), Genetics and Conservation of Rare Plants [C]. Oxford : Oxford University Press , 99—122
- Castilla AM, Fernandez-pedrosa V, Backeljau T, *et al*, 1998. Conservation genetics of insular *Podarcis* lizards using partial cytochrome b sequences [J]. *Molecular Ecology* , 7 : 1407—1411
- Chen D (程度), Huang YX (黄翔宇), Li BJ (李宝健), 2002. A method for preparation of high quality genomic DNA from medicinal fungi and construction of a genomic library [J]. *Mycosystema* (菌物系统) , 21 (1) : 137—139
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, 2002. Introduction to conservation genetics [M]. Cambridge : Cambridge University Press , 419—447
- Han CY (韩春艳), Sun WB (孙卫邦), Gao LM (高连明), 2004. Analysis of genetic diversity of *Trigonobalanus doichangensis* (Fagaceae) by RAPD [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究) , 26 (5) : 513—518
- Jover MA, Castillo-Agudo LD, Garcia-Carrascosa M, *et al*, 2003. Random amplified polymorphic DNA assessment of diversity in western Mediterranean populations of the seagrass *Posidonia oceanica* [J]. *Amer J Bot* , 90 (3) : 364—369
- Kikuchi S, Isagi Y, 2002. Microsatellite genetic variation in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* ssp. *japonica* [J]. *Heredity* , 88 : 313—321
- Kingston N, Waldren S, Smyth N, 2004. Conservation genetics and ecology of *Angiopteris hauliodonta* Copel. (Marattiaceae), a critically endangered fern from Pitcairn Island, South Central Pacific Ocean [J]. *Biological Conservation* , 117 : 309—319
- Kjoer ED, Graudal L, Hansen CP, 1998. Conservation of forest genetic resources for improved tree planting in the tropics [DB/OL]. [Http : //www.dfsc.dk/pdf/conference%20papers/1.pdf](http://www.dfsc.dk/pdf/conference%20papers/1.pdf)
- Li P (李鹏), Du F (杜凡), Pu XL (普晓兰), *et al*, 2004. RAPD analysis of different varieties types of *Dendrocalamus sinicus* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究) , 26 (3) : 290—296
- Li QM, Xu ZF, He TH, 2002. *Ex-situ* genetic conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China [J]. *Biological Conservation* , 106 : 151—156
- Li XD (李晓东), Huang HW (黄宏文), Li JQ (李建强), 2003. Genetic diversity of the relict plant *Metasequoia glyptostroboides* [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性) , 11 (2) : 100—108
- Ma XX (马信祥), Yang ZL (杨祝良), Xu ZF (许再富), *et al*, 1988. A study of the causes threatening *Pellacalyx yunnanensis*, a species receiving priority protection in China [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究) , 10 (3) : 311—316
- Maki M, Horie S, 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal less genetic variation in the endangered plant *Cerastium fischerianum* var. *molle* than in the widespread conspecific *C. fischerianum* var. *fischerianum* (Caryophyllaceae) [J]. *Molecular Ecology* , 8 : 145—150
- Marshall DR, Brown AHD, 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation [A]. In : Frankel O. H., Hawkes J. G. (Eds.), Crop Genetic Resource for Today and Tomorrow [C]. Cambridge : Cambridge University Press , 53—80
- Shi SH, Zhong Y, Huang YL, *et al*, 2002. Phylogenetic relationships of the Rhizophoraceae in China based on sequence of the chloroplast gene *matK* and the internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA and combined data set [J]. *Biochemical Systematics and Ecology* , 30 : 309—319
- Torres E, Iriando JM, Perez C, 2003. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae) : allozyme and RAPD analysis [J]. *Amer J Bot* , 90 (1) : 85—92
- Welsh J, Mc CM, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Research* , 18 (24) : 7213—7218
- Westemeier RL, Brawn JD, Simpson SA, *et al*, 1998. Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population [J]. *Science* , 282 : 1695—1698
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research* , 18 (22) : 6531—6535
- Yun Y (恽悦), Zhong M (钟敏), Wang HX (王洪新), *et al*, 1998. Study on DNA diversity of Liaodong oak population at Dongling mountain region, Beijing [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报) , 40 : 169—175
- Zhou HT (周涵韬), Lin P (林鹏), Zheng WZ (郑文竹), *et al*, 2001. Molecular classification of seven species of mangroves in Jiulongjiang Estuary in Fujian [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait* (台湾海峡) , 20 (1) : 66—72