昆明西山野生蘡薁葡萄资源及其遗传多样性分析。

赵 榕,钱正强,王焕冲,徐丰磊,宫 霞,陈 姝,杨明挚(云南大学生命科学学院植物科学研究所,云南昆明 650091)

摘要: 调查了昆明西山野生蘡薁葡萄(Vitis bryoniaegolia Bge) 的分布特征 ,并利用 RAPD 分子标记对其 5 个 群体的遗传多样性进行了分析. 采用 5 个 RAPD 引物扩增 ,共产生 71 条 DNA 条带 ,其中多态条带 68 条. 在物种水平上 .蘡薁葡萄多态位点百分率(PPB) 为 95. 77% ,Nei's 基因多样性指数(H) 为 0. 3442 ,Shannon's 多样性信息指数($H_{\rm sp}$) 为 0. 510 0; 在群体水平上 ,PPB 差异较大(35. 21% ~ 84. 51%) ,平均值为 60. 85% ,H 平均为 0. 223 4 $H_{\rm o}$ 平均为 0. 330 5. 各群体间的 Nei's 遗传一致度(I) 范围为 0. 717 1 ~ 0. 948 9. 基于 Nei's 遗传多样性分析得出的群体间遗传分化系数 $G_{\rm st}$ = 0. 326 9 ,表明西山蘡薁葡萄的遗传多样性主要来源与群体内而不是群体间. Mantel 检测发现 群体间的遗传距离和物理距离之间呈显著的正相关(r = 0. 981 P = 0. 019 < 0. 05) .

关键词: 野生葡萄资源; 蘡薁葡萄; RAPD; 遗传多样性分析

中图分类号: S 663.1 文献标识码: A 文章编号: 0258 - 7971(2010) 06 - 0710 - 05

全世界报道的葡萄属植物有70余种,分属于真葡萄亚属(Euvitis)和圆叶葡萄亚属(Muscadin-ia).葡萄属植物主要集中分布于欧亚-西亚分布中心、北美分布中心和东亚分布中心^[1].东亚分布中心约有40个种,而处于该中心的我国便拥有葡萄属的野生资源38种,约占世界的60%.葡萄是世界上栽培面积最大、产量最多的果树^[2].野生葡萄资源蕴含着抗寒、抗虫、抗病等诸多性状,是选育优良特性栽培葡萄品种的遗传资源宝库.

对野生葡萄种质资源的研究和利用早已受到许多国家的高度重视. 法国是世界著名的葡萄酒生产大国 拥有全球最大的种质资源圃和强大的科研团队 他们的成就得益于半个多世纪来对葡萄种质资源的有效收集、保护、研究和利用^[3]. 从 1983 年开始 意大利针对原产本国的野生葡萄的地理分布和生长特性 进行了全面系统的研究 到 1989 年,便建成野生资源圃,收集样本多达 400 余份^[4]. 我国对野生葡萄资源的研究和利用起步较晚,但部分研究已深入到分子水平^[5]. 罗素兰^[6]等对起源于我国的 83 个野葡萄种的变种或杂交种进行 RAPD

分析 根据聚类分析的结果认为菱叶葡萄和秦岭葡萄是中国野生葡萄中起源最古老的类型之一.

云南复杂多样的地理气候特征孕育了丰富的野生葡萄资源,分布有云南葡萄、刺葡萄、桦叶葡萄等 12 个种. 其中的蘡薁葡萄广泛分布在华北、华中、华东、西南、华南等地,属于广布种^[1]. 目前对该种野生葡萄的研究尚未见报道. 本文调查了位于云南昆明西山野生葡萄 5 个群体的的分布及生长特征,并利用 RAPD 分子标记技术研究了各群体内和群体间的遗传多样性,为进一步研究、保护和利用这一野生葡萄资源提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 采自昆明西山 5 个主要群体(群体 1~5)的野生葡萄,经鉴定属于葡萄科葡萄属蘡奥葡萄(Vitis bryoniaegolia Bge). 从距昆明 30 km 外的晋宁县境内采集的蘡薁葡萄样品定为群体 6. 采样时,对于个体大于 10 株的群体按照均匀分布随机取样的原则进行,若少于 10 株 则尽量采集所有样本. 采集新鲜幼嫩的叶片,于冰盒中保存备用.

^{*} 收稿日期: 2010 - 03 - 11

基金项目: 国家级大学生创新性试验计划项目(91067321); 云南大学生命科学学院植物科学研究所青年教师基金(WZ201001).

作者简介: 赵 榕(1983 -) ,女 ,内蒙古人 ,硕士生 ,主要从事植物生理方面的研究.

通讯作者: 杨明挚(1970-) 男 云南人 副教授 注要从事植物生理和分子生物学方面的研究.

1.2 方法

1.2.1 资源调查 对野生葡萄分布地点进行巡查并观察其生境、叶片形态、感病情况等,通过茎基部的直径以及分枝状况来粗略推测植株的年龄(每0.1 cm 的基部直径视为1 a 年龄).

1.2.2 总 DNA 的提取 应用北京百泰克生物公司的快速植物基因组 DNA 提取试剂盒 ,并按照相应的操作说明进行基因组 DNA 的提取 ,提取的 DNA 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. 据相对于 Marker 被 EB 染色的荧光强度 ,对总 DNA 的浓度进行估计 最终 DNA 模板质量浓度定量在 $2.5 \sim 5.0 \, \mathrm{ng/\mu L}$,置 $-20 \, \%$ 冰箱备用.

1.2.3 引物的筛选 随机引物委托上海生物工程公司合成,每个引物为10个随机排列的单核苷酸,在10个引物中筛选出5个多态性好的引物(表1),并用这5条引物分别对所有的样品进行RAPD分析.

表 1 蘡薁野生葡萄遗传多样性分析的 RAPD 引物

Tab. 1 Primers of RAPD for the genetic diversity of *V. bryoniaegolia*

引物	序列(5′ – 3′)	扩增条 带数	条带大小/bp
S161	ACCTGGACAC	12	800 ~ 3 000
S121	ACGGATCCTG	17	500 ~ 2 000
S123	CCTGATCACC	13	350 ~ 1 500
S1010	GGGATGACCA	13	300 ~ 900
S1140	GAGTCCTCAC	16	400 ~ 2 000

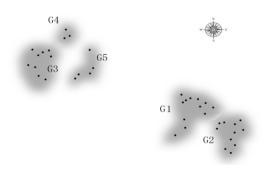
1.2.4 PCR 反应 PCR 反应参照曹辉庆等 $^{[2]}$ 的方法略作调整 ,反应混合物总体积为 25 μ L ,内含 $10 \times PCR$ 缓冲液 ,dNTP 各 200 μ mol • L^{-1} ,1.5 mmol • L^{-1} MgCl $_2$,0.2 μ mol • L^{-1} 的引物 25 ~ 30 ng 的模板 DNA ,1.5 U DNA 聚合酶(上海生物工程有限公司) ,在 PCR 仪(PC – 8185) 进行 40 个循环的反应. 反应条件为 94 $^{\circ}$ 预变性 4 min ,然后每个循环包括 94 $^{\circ}$ 变性 1 min ,35 $^{\circ}$ 飞退火 2 min ,72 $^{\circ}$ 飞 $^{\circ}$ 伸 2 min ,最后 1 个循环在 72 $^{\circ}$ 下延伸 8 min. 每个样品进行 3 次重复. 反应结束后 ,PCR 产物置于 4 $^{\circ}$ 冰箱中备用 ,或直接用 1.5 $^{\circ}$ 的琼脂糖凝胶电 泳检测.

1.2.5 数据分析 每个样品的扩增条带按有或无

记录,扩增条带存在的赋值为"1",否则赋值为"0".对 5 个引物的扩增结果用 POPGENE32 软件在假定种群处于 Hardy – Weinberg 平衡状态下进行遗传分析,分别计算出了多态位点百分率 (PPB)、平均每个位点的观测等位基因数(N_a)、平均每个位点的有效等位基因数(N_a)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon's 多样性信息指数(H_0 ,在物种水平上为 $H_{\rm sp}$,在群体水平上为 $H_{\rm pop}$)、总的基因多样性($H_{\rm t}$),群体内平均基因多样性($H_{\rm s}$)、遗传分化系数($G_{\rm st}$)、Nei's 遗传距离(D) 和遗传一致度(I)等,并进行聚类分析,构建各群体之间的遗传关系. SPSS13.0 软件分析群体间的遗传距离和地理距离之间的相关性.

2. 结果与分析

2.1 昆明西山蘡薁葡萄资源及其分布特征 昆明西山蘡薁葡萄的主要生境为华山松林下灌木丛,其分布类似于聚集分布中的核心分布模式.5 个蘡薁葡萄群体的分布模式及群体间的空间距离见图 1,生理生态特征见表 2. 西山蘡薁葡萄集中分布于海拔 2 100~2 400 m 的区域内, 各群体间或群体内植株的年龄结构差异较大(表 2). 花期为 3~5 月,结实率较低. 果期为 6~10 月,果实成熟期不一致,成熟果实呈紫红色,果实形状为球形或椭球形,直径 0.5~0.8 cm. 叶形具有典型的多形性,有的叶裂很深呈掌形,有的几乎无叶裂呈心形. 这种叶形的多形性表现在同一植株不同部位的叶片上或在不同植株上. 西山蘡薁野生葡萄叶片病害主要为虫害,微生物病害较少.



G1 与 G2 距离 200 m; G3 与 G4 距离 250 m; G5 与 G1 ,G2 距离 1 500 m; G5 与 G3 ,G4 距离 600 m

图 1 西山 5 个蘡薁葡萄群体的生态分布模式

Fig. 1 Distribation model of V. bryoniaegolia Beg 5 groups in Xishan moutain

表 2 西山 5 个蘡薁葡萄群体的生理生态特征

数量/	年龄结构/株			n l TZ	结实/ 感病		土质	>=+₽ /		
群体	群体	株	叶片/%	海拔/m						
群体 1	12	7	2	3	0	深裂至浅裂	3	25.0	壤土	2 215
群体 2	11	6	2	2	1	深裂至无裂	5	45.5	壤土	2 222
群体3	9	2	2	1	4	深裂至无裂	3	33.3	壤土及石灰岩	2 130
群体 4	3	1	2	0	0	深裂至浅裂	1	33.3	壤土及石灰岩	2 100
群体 5	5	1	2	2	0	深裂	0	20.0	石灰岩	2 330

2.2 西山蘡薁葡萄遗传多样性分析 从 10 个随机 引物中筛选出 5 个扩增谱带清晰、多态性好的引物,用于 40 份蘡薁葡萄材料基因组 DNA 的扩增(图 2). 共获得 71 条带,其中 68 条多态带. 在物种水平上 蘡薁葡萄的多态位点百分率 PPB 为 95.77%(表 3). Neis 基因多样性指数 H 为 0.344 2(± 0.156 8),Shannons 多样性信息指数 H_{sp} 为 0.5100(± 0.2007),

有效等位基因数 N_e 为 1. 602 4(±0. 333 9)(表 4);群体水平上,各个群体的多态位点百分率 PPB 差异较大(35.21%~84.51%),平均值为 60. 85%(表 3),Nei's 基因多样性指数 H 平均为 0. 223 4(±0. 202 5) Shannon's 多样性信息指数 H_0 平均为 0. 330 5(±0. 284 1),平均每个位点的有效等位基因数 N_e 为 1. 392 2(±0. 389 0)(表 4).

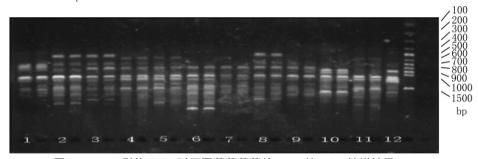


图 2 RAPD 引物 S121 对不同蘡薁葡萄总 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification results by using RAPD primer S121 to different DNA samples of V. bryoniaegolia

表 3 5 个蘡薁葡萄群体的多态位点百分率统计 Tab. 3 The PPB statistics of V. bryoniaegolia Bge groups

群体	多态位点数	多态位点百分率/%
群体 1	52	73.24
群体 2	60	84.51
群体3	41	57.75
群体4	25	35.21
群体 5	38	53.52
平均	43.2	60.85
物种水平	68	95.77

2.3 群体间遗传分化 用 POPGENE 软件计算出的遗传变异分析结果表明: 蘡薁葡萄总基因多样性指数 H_1 为 0.332 0(\pm 0.026 5), 群体内基因多样

性指数 H_s 为 0.223 5(± 0.016 0); Nei's 基因分化 系数 G_{st} = 0.326 9(表 5).

2.4 群体间遗传距离和遗传一致度 用 POPGENE 计算出了蘡薁葡萄 5 个群体两两群体间的 Neis 遗传一致度(I)和遗传距离(D).I在 0.717 1~0.948 9间; D在 0.052 5~0.332 5间(表 6).根据两两群体间的遗传一致度进行聚类(图 3).群体 3 和群体 4 的遗传一致度最高(I=0.948 9),遗传距离最近(D=0.052 5) 同时群体 5 也和它们聚在了一起;群体 1 和群体 2 另聚为一支 遗传一致度和遗传距离分别为 0.871 3 和 0.137 7.群体 1 和群体 4 间的遗传一致度最低,遗传距离最远,分别是 0.717 1 和 0.332 5.另一个样品群体 6 来源于 30 km 外的晋宁县境内,空间距离与上述 5 个群体均较远,在类聚树中也位于遗传距离最远的位置.

表 4	蘡薁野生葡萄群体的遗传多样性统计
-----	------------------

Tab. 4 T	he genetic	variation	of V .	bryoniaegolia	Bge
----------	------------	-----------	----------	---------------	-----

群体	观测等位基因数 $N_{ m a}$	有效等位基因数 $N_{ m e}$	Neis 基因多样性 H	Shannon's 信息指数 H ₀
群体 1	1.732 4 ± 0.455 9	1.4727 ±0.3820	0.270 5 ± 0.199 7	0.3996 ± 0.2790
群体 2	1.8451 ± 0.3664	1.4713 ± 0.3595	0.2773 ± 0.1810	0.4189 ± 0.2451
群体3	1.5775 ± 0.4975	1.3734 ± 0.4022	0.2115 ± 0.2111	0.3125 ± 0.2980
群体4	1.3521 ± 0.4810	1.2503 ± 0.3815	0.1400 ± 0.2021	0.2046 ± 0.2889
群体 5	1.5352 ± 0.5023	1.3931 ± 0.4200	0.2179 ± 0.2185	0.3169 ± 0.3096
平均	1.6085 ± 0.4606	1.3922 ± 0.3890	0.2234 ± 0.2025	0.3305 ± 0.2841
物种水平	1.9577 ± 0.2026	1.6024 ± 0.3339	0.3442 ± 0.1568	0.5100 ± 0.2007

表 5 蘡薁野生葡萄遗传多样性 Neis 分析

Tab. 5 Nei's analysis of gene divercity in V. bryoniaegolia Bge

统计项	总基因多样性 $H_{\scriptscriptstyle \rm t}$	群体内基因多样性 H_s	基因分化系数 $G_{ m st}$	基因流 $N_{\scriptscriptstyle m m}$
平均	0.3320	0. 223 5	0.3269	1.0297
标准差	0.0265	0.0160		

表 6 蘡薁葡萄 5 个群体间 Neiś 遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Tab. 6 Nei's genetic identity (a bove diagonal) and genetic distance of 6 groups of V. bryoniaegolia (below diagonal)

群体	1	2	3	4	5
群体1	* * * *	0.8713	0.7510	0.717 1	0.7786
群体2	0.1377	* * * *	0.8387	0.8067	0.8509
群体3	0. 286 3	0.1759	* * * *	0.9489	0.8696
群体4	0.3325	0.2148	0.0525	* * * *	0.8263
群体 5	0.2502	0.1614	0. 139 7	0.1908	* * * *

应用 SPSS13.0 软件进行相关性分析 .群体间的遗传距离和地理距离之间的皮尔森相关性系数 r = 0.981 (P = 0.019 < 0.05).

3 讨论

基于 RAPD 分子标记 利用 POPGENE 软件构建的不同群体的聚类结果(图3)发现 不同来源的蘡薁葡萄群体间的遗传距离与其实际地理分布距离呈正相关(r=0.981; P=0.019 < 0.05).因此,利用这5条 RAPD 引物就能够检测出分布较近的同种蘡薁野葡萄的不同群体甚至同一群体中的不同个体间的遗传差异 表明 RAPD 技术在种内近距离群体或个体间遗传多样性分析中具有可行性并有一定的优势.

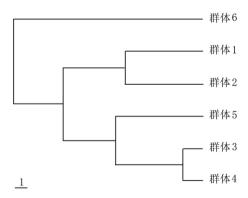


图 3 居于 RAPD 分子标记构建的不同居群的聚类图 Fig. 3 Phylogenetic tree based on the RAPD makers for different groups of *V. bryoniaegolia* Bge

蘡薁葡萄分布于华北、华中、华东西南及华南 地区 是我国分布最广的野生葡萄种之一[1]. 分布 的广泛性暗示了该种野葡萄对不同的地理气候环 境具有广谱适应能力. 我们在云南省的昆明市郊、 嵩明、晋宁、新平、元江、元谋等多个县均发现野生 蘡薁葡萄的存在. 在昆明西山,相距几百至1000 多 m 的不同群体间存在着较大的遗传差异(遗传 距离 D 的范围在 0.13~0.33 间),这种差异在更 远的的群体(群体 6)中更明显(D = 0.35)(表 6). 由此可以预见,广泛分布于全国各省不同地理气候 条件下的蘡薁野葡萄在种内的遗传差距将更大 遗 传多样性将更丰富 产生新的资源品质特征的可能 性也大. 所以 我们在进行种质资源的异地收集、保 存以及资源圃构建时,应尽可能多的从不同地理条 件下的群体中采样,最大限度地保存其遗传多样 性.

蘡薁葡萄被认为"杂性"植物^[1](即同一种内同时存在雌雄异株、雌雄同株异花、雌雄同花等多种性别的个体),对蘡薁葡萄种群繁殖方式等的研究尚未见报道. Bussell^[7] 曾对 35 个物种的 RAPD分析结果进行了总结,发现 29 个异交物种的群体间遗传变异占总的遗传变异的比率范围为 0.9% ~ 41.3% ,6 个近交物种的范围为 44.8% ~ 66.9% ^[8~11]. Hogbin and Peakall ^[12] 也总结了 7 个物种的 RAPD 分析结果,发现异交物种的遗传变异存在于群体内. 通过对 40 份野葡萄材料的 RAPD分析,Nei's 基因分化系数 $G_{st}=0.3269$,表明有67.31%的遗传变异存在于群体内,因此,西山的蘡薁葡萄主要以异交繁殖为主.

参考文献:

- [1] 孙庆山. 中国葡萄志 [M]. 北京: 中国农业科学出版 社. 2003
- [2] 曹辉庆 李杨瑞 彭宏祥. 利用 RAPD 分子标记对南

- 方湿热地区葡萄资源的亲缘关系及分类研究[J]. 西南农业学报 2004 ,17(1):61-64.
- [3] 翟衡. 法国葡萄种质资源保护与新品种选育 [J]. 中外葡萄与葡萄酒 1993 56(2):35-37.
- [4] 牛立新. 世界葡萄种质资源研究概况 [J]. 中外葡萄与葡萄酒 ,1994 ,70(3):18-20.
- [5] 张剑侠 涨艳艳 汪跃进 等. 中国野生葡萄抗黑痘病基因 RAPD 标记的克隆、序列分析及辅助育种应用 [J]. 果树学报 ,2009 26(4):456-460.
- [6] 罗素兰 ,贺普超 ,郑学勤 ,等. 中国野生葡萄遗传多样 性的 RAPD 分析 [J]. 植物学报 ,2001 ,43 (2):158-163.
- [7] BUSSELL J D. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeiaceae) [J]. Molecular Ecology 1999 & (5):775-789.
- [8] DAWSON I K CHALMERS K J WAUGH R et all. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers [J]. Molecular Ecology 1993 2:151-159.
- [9] DAWSON I K SUMONS A J ,WAUGH R et al. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of Gliricidia sepium revealed by PCR – based assays [J]. Heredity ,1995 4: 10-18.
- [10] BONNIN I ,HUGUET T ,GHERARDI M ,et al. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species , *Medicago trunculata* (*Leguminosae*) , shown using RAPD markers [J]. American Journal of Botany ,1996 83:843-855.
- [11] RUSSELL J R ,HOSEIN F ,JOHNSON E ,et al. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis [J]. Molecular Ecology ,1993 2: 89-97.
- [12] HOGBIN P M ,PEAKALL R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrate* [J]. Conservation Biology ,1999 ,13 (3):514-522.

A study on the distribution and genetic diversities of wild grape resources *Vitis bryoniaegolia* in Xishan mountain "Kunming

ZHAO Rong , QIAN Zheng-qiang , WANG Huan-ehong , XU Feng-lei , GONG Xia , CHEN Shu , YANG Ming-zhi

(Plant Science Institute School of Life Sciences ,Yunnan University ,Kunming 650091 ,China)

Feeding and food resource availability of Hoolock Gibbon (*Hoolock hoolock*) at Nankang , Mt. Gaoligong in spring and autumn

WU Jian-pu¹, ZHOU Wei¹, LUO Hong², DENG Zhong-jian¹, LI Jia-hong³, AI Huai-sen³
(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Southwest Forestry University Kunming 650224 China;
2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden Chinese Academy of Sciences Kunming 650223 China;

3. Baoshan Administration Gaoligongshan Natural Reserve Baoshan 678000 China)

Abstract: To understand the adaptation between feeding and food resources availability of Hoolock gibbon (Hoolock hoolock) by season changes and discuss the relationship between food resources availability and home range field investigation was conducted at Nankang Mt. Gaoligong from March to April and October to December in 2009. The food resources availability was surveyed by the line transect method the feeding behavior was recorded by the focal animal sampling method and the home range was recorded by the scanning samples method. The food resources availability and feeding amount in the grid were calculated and displayed by ArcGIS 9.3. The results showed that the availability of food resources and fruit food resources of Hoolock gibbon were correlated with feeding amount at Nankang from March to April and October to December. The availability of total food resources and fruit food resources was higher and also the distribution was more concentrated in March to April than October to December and there was just a little or even no food resources under 1 800 m. The home range of Hoolock gibbon overlapped the areas with higher availability of total food resources and fruit food resources during the two periods. The total food resources and fruit food resources availability inside and outside the home range made no difference from March to April , but was significant different from October to December. Hoolock gibbon tended to feed in the region with high food resource availability in the two periods. However the feeding areas changed by seasons and the area from Oct to Dec was larger than from Mar to Apr. The feeding regions partly overlapped during different seasons. Total available food resources amount was significantly correlated to the feeding amount in the grid from Mar to Apr but weakly correlated from Oct to Dec. The facts showed that the distribution of food resources of Hoolock gibbon was not uniform at Nankang. The food resources availability affected the choice of the home range of Hoolock gibbon. The feeding of Hoolock gibbon adapted to food availability by seasons.

Abstract: The ecological distribution characters of *Vitis bryoniaeglia* Beg from Xishan mountain in Kunming were investigated the genetic diversities based on the RAPD markers were studied in 5 groups of *Vitis bryoniaego-lia* Bge. The results indicated that 68 diversified loci in total 71 DNA bands were amplified by using 5 random primers. At species level the percentage of polymorphic bands (PPB), Nei's gene diversity (H) and the Shannon's information index ($H_{\rm sp}$) were 95.77% 0.3442 and 0.5100 respectively. While at groups level the average PPB was 60.85% (varied from 35.21%—84.51%). The average H and $H_{\rm o}$ were 0.2234 and 0.3305, respectively. The coefficient of genes differentiation among groups ($G_{\rm st}$) based on Nei's genetic distance was 0.3269 which implied that the gene variation was originated mainly within the groups (77.31%) other than among (32.69%) the groups. Genetic identity (I) of the 5 groups was varied from 0.7171 to 0.9489. The geographical distance was significant correlated with the genetic distance based by the Mantel analysis as r = 0.981, P = 0.019 < 0.05.

Key words: wild grape resources; *Vitis bryoniaegolia*; random amplified polymorphism DNA (RAPD) ; genetic diversity analysis