

基于 ISSR 遗传多样性分析的云南蓝果树保护措施探索

向振勇, 张珊珊, 杨文忠, 康洪梅

(云南省林业科学院珍稀濒危森林植物保护和繁育国家林业局重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 保存种群的遗传多样性和进化潜力是成功拯救保护濒危物种的关键。云南蓝果树 (*Nyssa yunnanensis* W. C. Yin) 是国家 I 级重点保护的极度濒危野生植物, 也是国家实施极小种群野生植物保护工程的目的物种。为了制定针对性的保护措施, 采用 ISSR 分子标记方法对 64 株极度濒危物种云南蓝果树子代个体进行遗传多样性分析。从 100 条引物中筛选出 12 条 ISSR 引物, 共扩增出 77 个稳定、清晰的条带。其中 58 个为多态性条带, 物种水平上的多态性条带百分率 (PPL) 变动范围为 50.00% ~ 87.50%, 平均值为 $(74.65 \pm 0.01)\%$; 等位基因观察值 (N_a) 为 1.7532; 有效等位基因观察值 (N_e) 为 1.5804; Nei's 基因多样性指数 (H_e) 为 0.3206, 多态性信息含量指数 (PIC) 变动范围为 0.15 ~ 0.44, 平均值为 0.27 ± 0.01 ; Shannon's 遗传多样性信息指数 (I) 随着样本数的增加而升高, 但当样本数达到 24 及以上时, Shannon's 指数的数值基本不再变化。基于遗传多样性分析结果, 从地质历史原因和人为干扰因素等方面对云南蓝果树的濒危机制进行了探析, 并提出了有针对性的云南蓝果树保护措施。

关键词: 云南蓝果树; ISSR 标记; 遗传多样性; 濒危机制; 科学保护

Conservation of *Nyssa yunnanensis* Based on Genetic Diversity Analysis Using ISSR Markers

XIANG Zhen-yong, ZHANG Shan-shan, YANG Wen-zhong, KANG Hong-mei

(Key Laboratory of Rare and Endangered Forest Plants of State Forestry Administration,
Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650201)

Abstract: Preserving genetic diversity and evolution potentials of the population is a key factor to successfully conserve an endangered species. *Nyssa yunnanensis*, a critically endangered and range-restricted tree species under national Grade I protection in China, has been projected in the conservation of species with extremely small populations. To explore and draw up the pertinent conservation strategies, we examined the genetic diversity of 64 *N. yunnanensis* individuals using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers generated by 12 ISSR primers. The results showed that the genetic diversity of natural population of *Nyssa yunnanensis* (PPL) ranged from 50.00% to 87.50% with a mean of $(74.65 \pm 0.01)\%$, alleles observed value (N_a) was 1.7532, effective alleles observed value (N_e) was 1.5804, Nei's genetic diversity index (H_e) was 0.3206, polymorphism information content (PIC) ranged from 0.15 to 0.44, with a mean of 0.27. Moreover, Shannon's index (I) of phenotypic diversity raised as the population size increased. But Shannon's index (I) had not been changed until the number reached 24. Based on results of genetic diversity analysis, we clarified the endangered mechanism of *N. yunnanensis* on the viewpoints of both geological history and contemporary hu-

收稿日期: 2014-06-03 修回日期: 2014-08-24 网络出版日期: 2015-04-10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150410.1604.004.html>

基金项目: 国家林业局珍稀濒危物种野外救护与繁育项目 (2012BY1002, 2013YB1002, 2014YB1004); 云南省极小种群物种拯救保护项目 (2013YB1005); 云南省创新人才培养项目 (2009CI098)

第一作者研究方向为极小种群野生植物保护。E-mail: xzy6106@126.com

通信作者: 杨文忠, 研究方向为极小种群野生植物保护与繁育。E-mail: wzyang2004@126.com

man disturbances. Conservation measures were suggested to maintain and increase genetic diversity, evolution potentials, and environment adaptability of *N. yunnanensis*, so as to successfully conserve this critically endangered species.

Key words: *Nyssa yunnanensis*; ISSR markers; genetic diversity; endangered mechanism; scientific conservation

云南蓝果树(*Nyssa yunnanensis* W. C. Yin)又名毛叶紫树,是蓝果树科(Nyssaceae)蓝果树属(*Nyssa* Gronov. ex Linn.)大乔木,属我国热带北缘的特有种,国家 I 级保护植物, IUCN 极度濒危物种^[1-2],被云南省列为优先拯救保护的极小种群物种。调查发现云南蓝果树野生资源目前仅存 8 株,人工保存植株 18 株;全部位于西双版纳州普文镇的普文试验林场,8 株野生植株相距较近,生长于同一溪流边,沿溪流分布,树高基本在 20~30 m,树干胸径平均在 40 cm 以上,野生植株中有 3 株结实^[3];云南蓝果树天然种群规模极小,自然更新能力差,已低于稳定存活界限,濒临灭绝,拯救保护已经刻不容缓。以往对云南蓝果树的研究主要集中在形态学修订、系统发育及种子萌发特性等方面^[4-6],未有从分子水平探究其濒危机制的研究。然而,物种保护的最终目标是保证种群的长期生存和进化潜力^[7],遗传多样性研究是成功保护濒危植物的重要保障^[8],了解物种水平上的遗传多样性信息是设计有效保护措施的基础,开展就地保护、近地保护和回归引种等保护措施,都需要遗传多样性研究结论的指导。

遗传多样性研究方法有很多种,其中基于 PCR 技术的 ISSR(inter simple sequence repeat)标记由于不需要背景或是遗传图谱研究信息、实验操作方法通用性强等,已广泛地应用于遗传多样性分析^[9-11]。因此,本研究采用 ISSR 标记方法对云南蓝果树子代进行研究,分析云南蓝果树的遗传多样性水平,揭示其濒危机制,进而为云南蓝果树的科学有效保护提供遗传学基础信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从西双版纳州普文镇普文试验林场云南蓝果树野外种群仅存的 3 株母树采集种子,育苗 64 株。其中,第 1、2 株母树子代均为 21 株,编号分别为 1~21 和 22~42,第 3 株母树子代 22 株,编号为 43~64。以 64 株幼苗为样本进行采样,采样时间为早晨

8:30-10:00,选取健康幼嫩叶片,于冰壶中带回实验室,用蒸馏水清洗干净、擦干,用液氮冷冻研磨后置于 -70℃ 超低温冰箱保存备用。

供试 100 条 ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学提供的序列,由上海生工生物工程公司合成。*Taq* DNA 聚合酶为北京全式金生物技术有限公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用改良 CTAB 法^[12]提取 DNA,以 1 μL λDNA 为参照,取云南蓝果树 1 μL DNA 提取液在 0.8% 琼脂糖凝胶中进行电泳,染色,拍照检测,检测提取后的 DNA 质量, -20℃ 保存备用。

1.2.2 ISSR 扩增 从 100 条 ISSR 引物中筛选出能扩增清晰明亮且重复性好谱带的 12 条引物,对 64 个样本进行 ISSR-PCR 扩增。采用 25 μL 体系: 2 × *Taq* Master Mix 12.5 μL,引物 5 μL,模板 DNA 2 μL,灭菌双蒸水 5.5 μL。PCR 反应程序参考李雪萍等^[13]对珙桐的扩增程序:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 42~55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 44 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。取 10 μL 反应产物在 1.8% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,溴化乙锭(EB)溶液中染色,凝胶成像分析仪中观察并拍照保存。

1.2.3 数据分析 电泳图谱中的每一条带代表一个分子标记,根据条带的有无进行 1、0 记数,在相同迁移位置上有条带记为 1、无条带记为 0,形成 0/1 矩阵,采用 POPGENE Version 1.31 进行数据分析,计算云南蓝果树多态性位点百分率(*PPL*)、等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 遗传多样性指数(*H*)、Shannon 信息指数(*I*)、各引物的多态性信息含量 *PIC* 值。计算公式: $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$,其中 P_{ij} 表示标记为 *i* 的第 *j* 个等位基因在群体中的频率。先根据试验结果计算出各个引物的等位位点数及频率,然后利用 *PIC_Calc* 0.6 计算各引物的 *PIC* 值。采用 NTSYS 2.10e 软件进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 云南蓝果树基因组 DNA 提取

采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示各

个泳道均出现 1 条清晰的 DNA 条带,基本无蛋白质和 RNA 污染,大多数无拖尾现象,表明提取的 DNA 完整性好(图 1)。

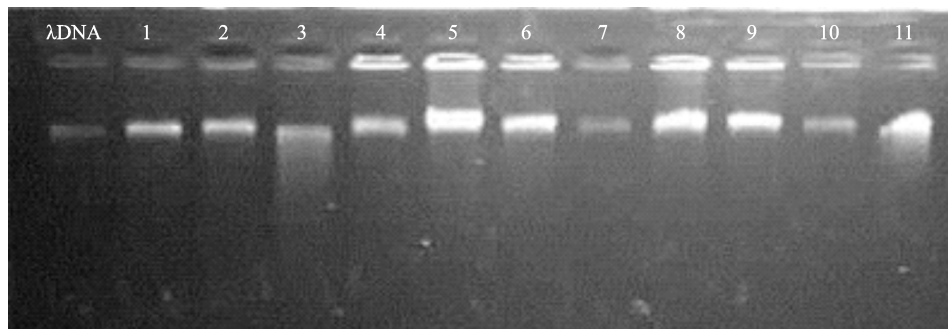


图 1 CTAB 法提取的部分云南蓝果树样品的 DNA 电泳图

Fig. 1 DNA electrophoresis of some samples of *Nyssa yunnanensis* by CTAB method

2.2 ISSR-PCR 扩增产物的多态性分析

用 64 个样品对加拿大哥伦比亚大学公布的 100 条 ISSR 引物序列(UBC primer set No. 9, University of British Columbia, Canada, <http://www.ubc.ca>)

进行筛选,最终选定 12 条引物进行云南蓝果树扩增分析。所选的 12 条引物对供试材料的扩增产物重复性好、特异性高、条带清晰且多态性丰富(图 2)。

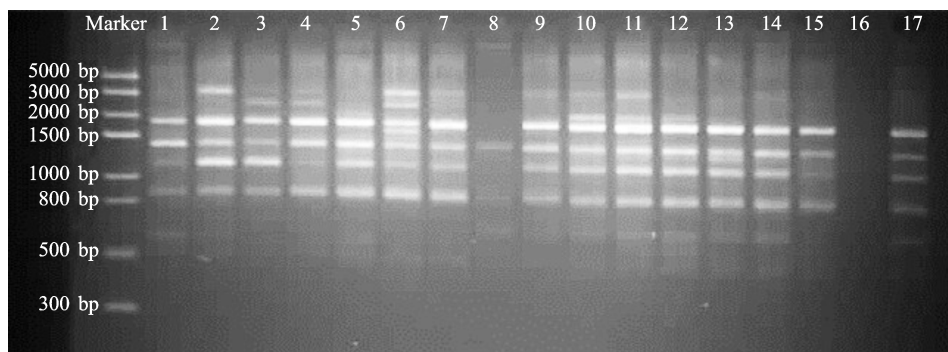


图 2 UBC#814 引物对云南蓝果树部分样品的 ISSR 扩增结果

Fig. 2 ISSR amplification of same samples from *Nyssa yunnanensis* using primer UBC#814

对 12 条引物的扩增结果进行统计,物种水平上,64 份云南蓝果树材料间共检测出 77 个等位基因,多态性条带 58 个。每个 ISSR 位点可检测到的等位基因数目为 4~10 个不等,平均每个 ISSR 引物检测到 6.42 个等位基因,多态性位点百分率(PPL)变动范围在 50.00%~87.50% 之间,平均值为 74.65%,DNA 分子量片段在 300~5000 bp 范围变化。不同引物扩增结果有较大差异,其中,引物 826 能扩增出 8 条谱带,且 7 条为多态性谱带,多态性位点百分率最高,达到 87.50%,而引物 825 仅扩增到 6 条谱带,3 条为多态性谱带,是多态性谱带水平最低的引物,多态性位点百分率为 50.00%(表 1)。由 POPGENE 软件计算得出:云南蓝果树等位基因数 $N_a = 1.7532$,有效等位基因数 $N_e = 1.5804$,Nei's

基因多样性 $H_e = 0.3206$,Shannon's 信息指数 $I = 0.4627$ 。等位基因数 N_a 与有效等位基因数 N_e 两个数值较为接近,说明云南蓝果树群体中纯合体多,杂合体不足,表明云南蓝果树多样性水平低。

另外,从表 1 还可以得知,不同引物多态性信息含量(PIC)值的变动范围在 0.15~0.44 之间,平均 PIC 值为 0.27。其中,低于 0.25 的有 5 条引物,占总引物数的 41.7%,在 0.25~0.5 之间的有 7 条,占总引物数的 58.3%,按 D. Bostein 等^[14]提出的衡量基因变异程度高低的的多态性信息含量 PIC 指标,当 $PIC > 0.5$ 时,该基因座为高度多态基因座; $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态基因座;当 $PIC < 0.25$ 时,则为低度多态基因座。因此,云南蓝果树的遗传多样性为中度偏低的水平。

表 1 不同引物的多态性

Table1 Polymorphism of different primer combination

引物 Primer	等位基因 Allele	多态性条带 Polymorphic bands	多态位点 百分率(%) Percentage of polymorphic loci	多态信息含量 Polymorphism information content
P807	5	4	80.00	0.44
P808	4	3	75.00	0.18
P809	7	5	71.43	0.33
P810	6	5	83.33	0.31
P811	10	8	80.00	0.24
P814	7	6	85.71	0.22
P815	5	3	60.00	0.15
P820	5	4	80.00	0.38
P822	7	5	71.43	0.19
P825	6	3	50.00	0.31
P826	8	7	87.50	0.27
P827	7	5	71.43	0.25
总和 Total	77	58	—	3.27
平均值 Mean	6.42	4.83	74.65 ± 0.01	0.27 ± 0.01

2.3 种群遗传多样性分析

种群内的遗传分化可用 Shannon's 指数进行估算,指数越大遗传多样性越大,种群分化的程度越高。将 64 个云南蓝果树样本随机以 3 为基数进行含有不同个体数量的群体划分,并进行 Shannon's 指数计算。计算结果显示:随着样本数量增加,Shannon's 指数随之增加;但当样本数达到 24 株以上时,Shannon's 指数相对稳定,不再增加;且样本数达到 24 株时,Shannon's 指数达到总样本数的 95.4%。说明当云南蓝果树达到 24 株样本时,已经能够代表该物种的遗传多样性水平(图 4)。

2.4 64 株云南蓝果树聚类分析

采用 UPGMA 法对 64 株云南蓝果树进行聚类分析(图 5),在遗传相似系数 0.68 处可被分为 2 类。第 I 类包括 63 株,占总株数的 98.44%,第 II 类包括 1 株,占总株数的 1.56%。

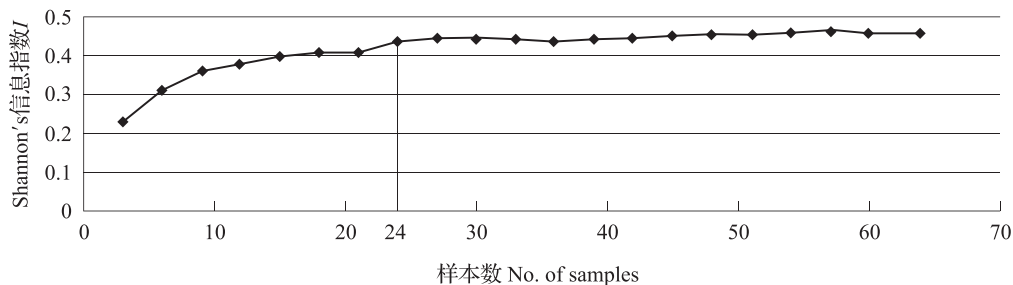


图 4 种群遗传多样性与种群大小的关系
Fig.4 Relationship between genetic diversity and population size

3 讨论

3.1 濒危机制探析

云南蓝果树野生资源目前仅存 8 株,全部位于西双版纳州普文镇的普文试验林场,8 株野生植株相距较近,均生长于同一溪流边,沿溪流分布,树高基本在 20 ~ 30 m,树干胸径平均在 40 cm 以上,采集新鲜幼叶十分困难。野生植株中,有 3 株母株,均已结实^[3],云南蓝果树是雄性两性异株植物^[4]。雄花与两性花花期一致,母株得到充分授粉,其繁育的后代对云南蓝果树总体的遗传多样性已具有良好的代表性。从 64 株云南蓝果树的聚类图看,可将其聚为 2 大类,且聚类分类的结果与母株的来源并不相关,绝大部分的植株均聚于第 I 类中。遗传多样性

是物种为适应环境和维持生存而长期进化的物质基础^[15];分子水平的遗传多样性主要是基因多态性,可从丰度(richness)和匀度(evenness)两方面来衡量^[16]。丰度上看,云南蓝果树基因多态位点百分率(PPL)为 74.65%,低于同类群植物珙桐 93.81% ~ 96.10% 的基因多态性位点百分率^[13,17]。本研究各引物的多态信息含量 PIC 值为 0.15 ~ 0.44,其中 PIC 值低于 0.25 的引物条数占 41.7%,在 0.25 ~ 0.5 之间的占 58.3%,平均 PIC 值为 0.27。因此,从丰度和匀度上,云南蓝果树的遗传多样性都处于中度偏低的水平。

遗传多样性水平的高低决定了物种对环境的适应能力,一个物种需具备一定的遗传多样性才能抵御各种生存压力,并逐步扩展其分布范围^[15]。

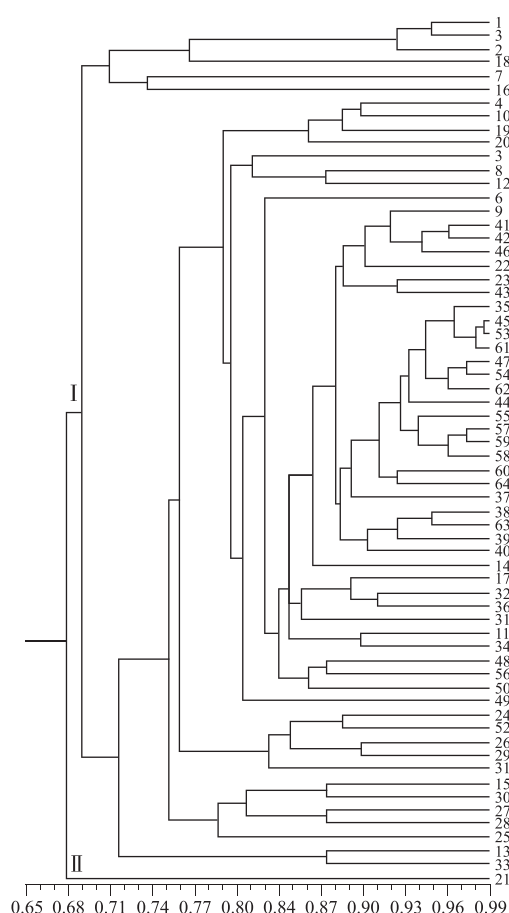


图 5 64 株云南蓝果树的聚类图

Fig. 5 The cluster analysis diagram of 64 samples

J. L. Hamrick 等^[18]和 J. D. Karron^[19]的研究显示,相同或不同类群狭域特有种的遗传变异水平都明显低于广布种。云南蓝果树是地理上和进化上的残遗种,在地质历史时期遭受了毁灭性灾害,使其数量急剧下降,丧失了大部分遗传多样性,较低的遗传多样性水平反过来又限制了云南蓝果树对现代环境变迁的适应能力,使其分布范围更加狭窄。据标本采集信息,云南蓝果树分布于南北相距 70 km 的狭小范围内(南自勐罕,北至普文),属云南南部热带与南亚热带过渡区的狭域特有种^[3];结合云南蓝果树天然更新能力差、林下无幼苗等野外观察试验结果,认为云南蓝果树遗传多样性水平低,可能是导致其环境适应能力不足、分布范围狭窄的主要原因。

人为干扰导致云南蓝果树种群数量和规模的急剧下降。近年随着社会经济的快速发展,特别是当地通过依赖扩大经济作物种植面积来发展地方经济的模式,使原生境在内的大量天然林不断被橡胶、咖啡、茶叶等经济林所取代,人类活动导致的生境破坏和片段化直接导致云南蓝果树生境小,气候发生改

变。据标本(含模式标本)提供的信息,自 1957 年至 2010 年的 50 余年间,云南蓝果树当前分布区面积仅为原有分布面积的 1/25,仅存普文林场天然林内一个分布点,面积约 50 hm²;种群数量和规模骤降,仅存 8 株天然植株^[3]。因此,认为生境破坏和小气候变化等人为干扰因素,加剧了云南蓝果树现代分布范围和种群数量的减少,物种濒临灭绝。

3.2 保护措施建议

基于对云南蓝果树遗传多样性的分析结果和濒危机制的探析,建议开展如下保护措施:

(1)合理构建种群,降低保护成本。R. Frankham 等^[20]和康明等^[21]对遗传多样性保护的研究显示,在 100 年内保持其 90% 以上的遗传多样性即为成功保护。本研究对现存云南蓝果树种群遗传多样性分析结果显示,当取样数量达到 24 株时,其遗传多样性水平达到总体的 95.42%,且在取样数量增加时,其遗传多样性不再明显上升。因此,无论开展天然种群保护还是人工种群构建,只需在合理获取繁殖材料的基础上,保证种群数量不少于 24 株,就可以成功保存云南蓝果树的遗传资源。为获取有效繁殖材料,应采集所有结实植株的种子,同时开展雄株的无性繁殖,以保证繁殖材料的遗传多样性信息。在构建人工种群时,应将来自不同母株的苗木交互定植,避免近交衰退。

(2)开展回归引种,恢复天然种群。在保护现存天然种群 8 株的基础上,于现存分布点按上述方法构建种群,开展回归引种和恢复天然种群。同时,于勐罕至普文之间的原分布范围内,选择原生地或与原生地生境相似的自然或半自然区域,通过选择与布局、生态小环境适宜性分析和优化,开展回归引种设计,并在不破坏原生植被的前提下,开展回归引种、恢复天然种群,增加云南蓝果树的天然种群数量,维持其遗传多样性水平,保存物种进化潜力。

(3)开展近地保护,提高物种适应能力。根据引种驯化的气候相似理论,于云南蓝果树原有分布区的邻近区域,即比勐罕更靠南或较普文更靠北的区域,选择生境条件(小气候、土壤、植被等)相近的自然或半自然地段,按上述方法构建云南蓝果树种群,开展近地保护,以通过适当增加云南蓝果树的环境压力,为提高遗传多样性水平创造外部条件,并锻炼其在新环境中的适应能力,达到拓展分布区域的目的。

参考文献

- [1] 汪松,谢炎. 中国物种红色名录:第 1 卷[M]. 北京:高等教育出版社,2004

- [2] 李玉媛,司马永康,方波,等. 云南省国家重点保护野生植物资源的现状与评价[J]. 云南植物研究, 2003, 25(2):181-191
- [3] 陈伟,史富强,杨文忠,等. 云南蓝果树的种群状况及生态习性[J]. 东北林业大学学报,2011,39(9):17-19
- [4] 孙宝玲,张长芹. 极度濒危植物云南蓝果树的形态修订[J]. 云南植物研究,2007,29(2):173-175
- [5] 孙宝玲,张长芹,周凤林,等. 极度濒危植物-云南蓝果树的种子形态和不同处理条件对种子萌发的影响[J]. 云南植物研究,2007,29(3):351-354
- [6] 袁瑞玲,向振勇,杨文忠,等. 云南蓝果树种子休眠与萌发特性[J]. 林业科学研究,2013,26(3):384-388
- [7] Cao P J, Yao Q F, Ding B Y, et al. Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. Biochem Syst Ecol, 2006, 34:231-239
- [8] Hamrick J L, Godt M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species[J]. Phil Trans Roy Soc London Biol Sci, 1996, 351:1291-1298
- [9] 李瑞奇,杨鑫雷,张艳,等. 河北省冬小麦品种 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(3):526-533
- [10] 晏慧君,付坚,李俊,等. 云南普通野生稻遗传多样性和亲缘关系[J]. 植物学通报,2006,23(6):670-676
- [11] 魏玉杰,张金文,何庆祥,等. 不同生态区罂粟种质的遗传多样性 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2):239-243
- [12] 张玉晶,李牡丹,石旭,等. 珙桐基因组 DNA 的提取及 ISSR-PCR 体系的优化[J]. 山地农业生物学报, 2011, 30(3):211-214
- [13] 李雪萍,郑雪,朱文琰,等. 濒危植物珙桐遗传多样性与遗传结构的 ISSR 分析[J]. 广东农业科学,2012(6):121-123
- [14] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3):314-331
- [15] 陈灵芝. 中国的生物多样性-现状及其保护对策[M]. 北京:科学出版社,1993
- [16] 郭钰,李亚莉,黄媛,等. 云南迪庆藏族自治州青稞种质资源亲缘关系的 SSR 标记分析[J]. 基因组学与应用生物学,2011(30):1174-1181
- [17] 张玉梅,徐刚标,申响保,等. 珙桐天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析[J]. 林业科学,2012,8(48):62-67
- [18] Hamrick J L, Godt M J. Allozyme diversity in plant species[M]//Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sunderland: Sinauer associates, 1990:43-63
- [19] Karron J D. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species[M]//Flak D A, Holsinger K E. Genetic and Conservation of Rare Plants. New York: Oxford University Press, 1991:87-98
- [20] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics[M]. UK: Cambridge University Press, 2002
- [21] 康明,叶其刚,黄宏文. 植物迁地保护中的遗传风险[J]. 遗传, 2005, 27(1):160-166