

# 鼎湖山厚壳桂 *Cryptocarya chinensis* 不同年龄级 种群遗传多样性\*

高三红<sup>1</sup>, 王峥嵘<sup>2</sup>, 张军丽<sup>1</sup>, 田胜尼<sup>2</sup>

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

2. 中国科学院华南植物园广东省数字植物园重点实验室, 广东 广州 510650)

**摘要:** 采用 ISSR 分子标记技术, 对鼎湖山常绿阔叶林中的演替顶极种厚壳桂不同年龄级的遗传多样性进行了研究。同其它生活史特性相似的物种相比较, 鼎湖山厚壳桂种群的遗传多样性水平偏低 ( $H_T = 0.109 0$ )。3 个不同年龄级——成体、小树、幼苗的遗传多样性 ( $H_s$ ) 分别为 0.075 9、0.095 6 和 0.126 5。幼苗的遗传多样性指数高于成体及小树。3 个不同年龄级种群之间的遗传分化  $G_{st}$  和  $\phi_{st}$  (AMOVA) 分别为 0.089 0 和 0.064 4 ( $P < 0.000 2$ ), 表明厚壳桂年龄级之间遗传分化较小, 但分化显著。成体、小树、幼苗之间, 其遗传距离随着年龄级逐渐加大。鼎湖山厚壳桂低的遗传多样性是由于缺乏不同地区种群间基因流造成的, 但世代间遗传分化可能由取样误差所产生。

**关键词:** ISSR; 厚壳桂; 遗传多样性; 年龄级

**中图分类号:** Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) S1-0209-04

遗传多样性是指地球上所有生物携带的遗传信息的总和, 是生物多样性的重要组成部分<sup>[1]</sup>。遗传多样性是生物生存、发展、进化的基础, 并体现在不同水平上: 种群、个体、组织和细胞以及分子<sup>[2]</sup>。

种群作为进化的基本单位, 在自然界中有着特定的分布格局, 形成种群遗传结构。一个物种的进化潜力和对环境的适应能力既取决于种内遗传变异的大小, 也有赖于种群的遗传结构<sup>[2]</sup>。种群遗传结构受到多种因素的影响, 其中最主要的是突变、自然选择、遗传漂变、种群迁移、繁育系统<sup>[3]</sup>。对植物种群来说, 还有种子休眠状况、花粉和种子的传播方式、物候等也影响到种群的遗传结构<sup>[4-6]</sup>。所有这些因素作用于种群亲代身上, 必将影响到它们后代遗传结构, 因此通过种群不同世代遗传结构比较研究才有可能反映种群整体遗传多样性状况, 把握其动态变化规律。

厚壳桂 *Cryptocarya chinensis* (Hance) Hemsl., 樟科 Lauraceae, 厚壳桂属 *Cryptocarya*, 产四川、广西、广东、福建及台湾<sup>[7]</sup>, 为亚热带常绿阔叶林演替顶极种。作为中生性植物, 厚壳桂只在森林郁闭度较大时才出现, 是森林依赖性树种。森林的择伐和砍伐都对其生长繁殖不利<sup>[8]</sup>。近年来亚热带

常绿阔叶林因人类活动的影响, 其分布面积日渐萎缩<sup>[9]</sup>, 厚壳桂适宜的生存环境也逐渐缩小。本研究通过比较鼎湖山厚壳桂 3 个不同年龄级种群遗传多样性水平, 揭示厚壳桂遗传多样性的现状及其可能变化规律, 为南亚热带物种保护和生物资源的合理开发利用提供理论依据。

## 1 研究地点概况

鼎湖山自然保护区位于广东省西江下游北岸, 毗邻珠江三角洲, 北纬 23°10', 东经 112°34'。大部分为低山丘陵, 海拔多在 100 ~ 700 m 之间。鼎湖山气候属亚热带季风湿润型气候, 全年干湿季交替明显, 年降雨量 1 956 mm, 3-9 月为雨季, 10 月至次年 2 月为旱季。土壤主要是由泥盆纪厚层变质砂岩、砂页岩发育形成赤红壤<sup>[10]</sup>。

季风常绿阔叶林是亚热带所特有的森林类型, 这一林型在鼎湖山有 400 多 a 的林龄, 是鼎湖山自然林中最大的群落, 也是地带性植被顶极群落<sup>[11]</sup>。这一林型主要优势种有厚壳桂、黄果厚壳桂 *Cryptocarya concinna* Hance 等。除了在常绿阔叶林中作为优势种群出现外, 厚壳桂还在鼎湖山次生针阔混交林中有生长。

\* 收稿日期: 2005-01-12

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30300055); 广东省自然科学基金 (031264); 瑞典 IFS 基金 (D/3239-1); 中国科学院华南植物园所长基金资助项目

**作者简介:** 高三红 (1976 年生), 女, 硕士; **通讯联系人:** 王峥嵘; E-mail: wzf@scbg.ac.cn

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

2003年6月在鼎湖山自然保护区根据厚壳桂的分布范围分3个年龄级随机采样。年龄级划分参照王伯荪等<sup>[12]</sup>, 成体: 胸高直径在7.5 cm以上; 小树: 胸高直径在2.5~7.5 cm之间; 幼苗: 高度小于1 m, 胸高直径不足2.5 cm。各年龄级各采集30株个体, 每株采集2~3片无损叶样, 迅速装入备有硅胶的密封袋中, 同时记录它们的株高或胸径。在之后的分析中, 发现采集的成体中有一个为误采, 故舍弃不用。

### 2.2 基因组 DNA 提取与 ISSR (Inter - simple Sequence Repeats) - PCR 扩增

采用改良 CTAB 法提取厚壳桂叶片基因组 DNA<sup>[13]</sup>。ISSR 引物购于哥伦比亚大学 (UBC)。从100个引物中筛选7个扩增条带多、多态性高的引物(表1)。之后, 对 ISSR 反应体系进行优化, 其中包括: 模板约 20 ng, 0.5 U *Taq* 酶 (Takara Biotechnology Co.), 1.5~2.5 mmol/L  $MgCl_2$  (依引物不同而改变), 4种 dNTPs 各 0.2 mmol/L, 0.6  $\mu$ mol/L 引物。PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}C$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}C$  变性 1 min, 48  $^{\circ}C$ ~55  $^{\circ}C$  复性 45 s (依引物不同而改变), 72  $^{\circ}C$  延伸 1.5 min, 35 个循环之后 72  $^{\circ}C$  反应 10 min。PCR 产物在  $w = 4\%$  变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 银染显色。

表1 对鼎湖山厚壳桂 89 个个体进行 PCR 扩增的 ISSR 引物<sup>1)</sup>

Tab.1 ISSR primers used for 89 individuals of *Cryptocarya chinensis*

引物编号	引物序列	退火温度 / $^{\circ}C$	多态性条带数
807	AGAGAGAGAGAGAGACT	50	18
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52	28
825	ACACACACACACACT	50	32
826	ACACACACACACACC	52	33
842	GAGAGAGAGAGAGAYG	55	14
864	ATGATGATGATGATGATG	50	20
873	GACAGACAGACAGACA	48	64

1) Y = (C, T)

### 2.3 数据处理

将上述电泳产物所得的各带进行 1/0 标记。采用 POPGENE 软件对厚壳桂种群及其各个年龄级分别进行以下遗传参数分析。包括 *Nei* 基因多样性 ( $H_e$ )、*Nei* (1978) 遗传距离, 以及年龄级间的遗传分化指数 ( $G_{st}$ )。为方便比较, 同时再使用

AMOVA (Analysis of Molecular Variance, ver 1.55)<sup>[14]</sup> 分析厚壳桂不同年龄级间的遗传分化, 其中各基因型之间的差异用  $(1 - S)$  来衡量,  $S$  为 *Nei* & *Li* (1985) 相似性系数, 计算公式如下:

$$S = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$$

其中  $N_{AB}$  为两基因型共有扩增带,  $N_A$  为基因型 A 拥有的扩增带,  $N_B$  为基因型 B 拥有的扩增带<sup>[15]</sup>。

## 3 结果与分析

用筛选出的7个引物对厚壳桂3个年龄级共89个DNA样品进行PCR扩增。银染显色共检测到209条多态带(表1)。

厚壳桂成体、小树和幼苗的 *Nei* 遗传多样性 ( $H_e$ ) 分别为 0.075 9 ( $\pm 0.134 6$ )、0.095 6 ( $\pm 0.160 6$ ) 和 0.126 5 ( $\pm 0.189 9$ )。总的遗传多样性 ( $H_T$ ) 为 0.109 0 ( $\pm 0.162 6$ )。

AMOVA 分析结果表明总的遗传变异中, 6.44% ( $P < 0.000 2$ ) 的遗传变异存在于不同年龄级之间 (即  $\phi_{st} = 0.064 4$ ), 93.56% ( $P < 0.000 2$ ) 的遗传变异存在于年龄级内。这和 POPGENE 软件算出的厚壳桂年龄级间的遗传分化系数结果相近 ( $G_{st} = 0.089 0$ )。

总体上各年龄级之间的遗传距离很小。其中成体同幼苗之间的遗传距离最大, 为 0.023 2。成体同小树, 小树同幼苗之间的遗传距离分别为 0.005 1 和 0.012 9, 表明遗传距离随着年龄级差异逐渐加大。

## 4 讨论

*Nybom* & *Bartish*<sup>[16]</sup> 首次统计分析了采用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 方法进行物种遗传多样性研究的结果, 表明具有不同生活史特性的 41 种植物中, 多年生植物遗传多样性 ( $H_e$ ) 平均为 0.242, 地区分布种为 0.222, 演替后期种为 0.287, 种子自身重力传播的为 0.212。本实验采用 ISSR 方法, 和 RAPD 方法一样都为显性标记, 因此在数据处理结果上有较强的可比性。从我们的结果看, 与上述具有相同生活史特征的物种相比, 厚壳桂 (鼎湖山) 遗传多样性 ( $H_T = 0.109 0$ ) 远小于它们。虽然我们还不清楚厚壳桂具体交配系统形式, 但我们的结果也远小于文献 [16] 所统计的具有混交 ( $H_e = 0.219$ ) 和远交 ( $H_e = 0.260$ ) 类型的物种。我们推测鼎湖山地区厚壳桂种群如此低的遗传多样性可能是由于低的种群间 (和其它地区种群) 基因流造成的。在广东省亚热带, 特别是珠

三角地区(包括鼎湖山), 经济发展所带来的环境压力非常大, 植被破坏非常严重, 仅存的少数原生植被只零散于少数保护区, 破碎化导致基因流不畅是很可能的。基因流的限制又使种群内随机遗传漂变影响作用增大, 导致鼎湖山地区厚壳桂种群低的遗传多样性。

目前, 对植物种群遗传结构的研究, 多是从单一世代的角度展开, 或只是研究了种群某一代遗传结构, 或并不提及种群世代, 不利于从时间动态角度揭示植物的遗传多样性现状。如在森林片断化种群遗传结构影响研究中, Collevati 等<sup>[17]</sup>在巴西研究森林片断化对 *Caryocar brasiliense* 的遗传影响时, 虽然并未发现片断化的遗传危害, 但他们研究对象多为 *C. brasiliense* 的成体(adults), 在片断化以前就已生长, 因此片断化是否对后代造成遗传危害尚不清楚。

而 Dayanandan 等<sup>[18]</sup>、Aldrich 和 Hamrick<sup>[19]</sup>均采用世代分析的方法对各自不同的物种开展了相关研究工作。Dayanandan 等<sup>[18]</sup>通过对哥斯达黎加(Costa Rica)的 *Carapa guianensis* 亲代与后代(即 adults 和 saplings)种群遗传结构进行比较和分析, 发现片断化森林中的后代未受到近交影响, 但其遗传结构已明显偏离亲代, 同时其等位基因丰富程度(allelic richness)已有下降; 且后代个体之间的遗传距离大于亲代个体之间, 表明由于森林片断化引起基因流受阻。Aldrich & Hamrick<sup>[19]</sup>在同一地区对 *Symphonia globulifera* 的研究中发现片断化森林中的亲代(adults)由于在片断化之前就已生长, 因此森林片断化对其遗传结构影响较小, 但片断化种群中的后代(seedlings)遗传结构明显受到近交影响, 且不同片断化森林中种群后代之间的遗传分化也增大了, 同时他们还发现森林片断化使得少数亲代个体生长繁殖上占优势, 造成片断化森林中多数后代来源于这少数几个个体, 由此在后代产生遗传瓶颈。

另外, 还有从植物地上部与地下种子库进行的世代遗传多样性比较研究。种子库在维持地表植物种群的遗传多样性方面具有重要意义。McCue & Hultsford<sup>[20]</sup>认为种子库可以作为植物种群的“基因库(genetic reservoirs)”, 缓冲地上部种群由于环境因素带来的不良影响。他们研究发现 *Clarkia springvillensis* 的种子库的遗传多样性( $H_e = 0.355$ )明显高于地上种群( $H_e = 0.260$ ), 并且种子库的遗传分化显著低于成体间的遗传分化, 这种结果在小种群中更为明显。

但 Cabin 等<sup>[21]</sup>在不同时期对同一物种

*Lesquerella fendler* 的研究结果表明, 不同时期土壤种子库和地上部遗传差异是不同的。Cabin 等<sup>[22]</sup>认为这是由于不同时期存在对不同遗传型幼苗的选择机制。Tonsor 等<sup>[4]</sup>的研究结论也认同这一观点。Tonsor 等<sup>[4]</sup>比较 *Plantago lanceolata* 的种子库同其幼苗及成体的遗传多样性, 他们认为因存在着有利于杂合性幼苗生存的选择机制, 导致从种子库到幼苗至成体杂合度增加。

在我们的研究中, 厚壳桂为演替顶极种, 其种子多为当年落地萌发, 不存在较大的土壤种子库<sup>[10]</sup>, 因此厚壳桂土壤种子库对地上部的遗传多样性影响较小。

本研究中所选择的厚壳桂 3 个不同年龄级, 在世代上虽不是连续的, 但可代表厚壳桂老、中、幼 3 个生活史阶段。但鼎湖山厚壳桂成体、小树、幼苗 3 个年龄级的遗传结构存在一定的差异: 幼苗遗传多样性高于成体及小树; 随着年龄级的增大, 年龄级间的遗传距离增大; 各世代间有较显著的遗传分化, 但我们认为这更可能是由于取样效应引起的误差。因为由 ISSR 结果分析, 与厚壳桂成体相比, 我们并未发现在幼苗和小树中有新的等位基因, 因此幼苗和小树大的遗传多样性主要是各年龄级间的基因频率分布不同所造成的, 而这主要受选择作用和近交等影响, 但近交作用于厚壳桂成体必然导致其后代遗传多样性的减少, 而非增大, 那么是否存在某种选择压力会导致世代间等位基因频率变化, 还需进一步研究。但从野外采样看, 厚壳桂为优势树种, 种群数量很大, 我们只分析了 3 个年龄级的各 30 个左右的个体, 还不能充分代表种群各世代遗传多样性, 因此我们所发现的厚壳桂低幼龄高的遗传多样性可能由采样量不足有关(采样多少影响到等位基因频率的变化), 更多的问题需要增大采样量, 同时采用共显性遗传标记等来进行深入研究。但地区广布种厚壳桂遗传多样性的丧失表明本地区生态环境破坏严重, 这对其它濒危物种威胁可能更大, 急需开展有针对性研究保护。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 葛颂, 洪德元. 生物多样性研究的原理与方法. 遗传多样性及其检测方法 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1994.
- [3] BOSHIER D H, CHASE M R, BAWA K S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood, and population substructure [J]. *Am J Bot*, 1995, 82 (4): 484 - 490.

- [4] TONSOR S J, KALISZ S, FISHER J, et al. A life - history based study of population genetic structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata* [J]. *Evolution*, 1993, 47: 833 - 843.
- [5] EVANS A B, CABIN R J. Can dormancy affect the evolution of post - germination traits? The case study of *Lesquerella fendleri* [J]. *Ecology*, 1995, 76: 344 - 356.
- [6] FENSTER C B. Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). I. Gene dispersal [J]. *Evolution*, 1991, 45: 398 - 409.
- [7] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第三十一卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [8] 彭少麟. 南亚热带森林群落动态学 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [9] 彭少麟. 南亚热带演替群落的边缘效应及其对森林片断化恢复的意义 [J]. *生态学报*, 2000, 20(1): 1 - 8.
- [10] 黄忠良, 孔国辉, 魏平, 等. 南亚热带森林不同演替阶段土壤种子库的初步研究 [J]. *热带亚热带植物*, 1996, 4(4): 42 - 49.
- [11] 彭少麟. 森林群落波动的探讨 [J]. *应用生态学报*, 1993, 4(2): 120 - 125.
- [12] 王伯荪, 李鸣光, 彭少麟. 植物种群学 [M]. 广州: 高等教育出版社, 1995.
- [13] DOYLE J J. DNA protocols for plants - CTAB total DNA isolation // HEWITT M, eds. *Molecular Techniques in Taxonomy* [M]. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1991: 283 - 293.
- [14] EXCOFFIER L, SMOUSE P E, QUATTRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 1992, 131: 479 - 491.
- [15] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1985, 76: 5269 - 5273.
- [16] NYBOM H, BARTHS I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2000, 3: 93 - 114.
- [17] COLLEVATTI R G, GRATTAPAGLIA D, HAY J D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci [J]. *Mol Ecol*, 2001, 10: 349 - 356.
- [18] DAYANANDAN S, DOLE J, BAWA K, et al. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae) [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8: 1585 - 1592.
- [19] ALDRICH P R, HAMRICK J L, CHAVARRIAGA P, et al. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera* [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 933 - 944.
- [20] MCCUE K A, HOLTSFORD T P. Seed bank influences on genetic diversity in the rare annual *Clarkia springvillensis* (Onagraceae) [J]. *Am J Bot*, 1998, 85(1): 30 - 36.
- [21] CABIN R J, MITCHELL R J, MARSHALL D L. Do surface plant and soil seed bank populations differ genetically? A multipopulation study of the desert mustard *Lesquerella fendleri* (Brassicaceae) [J]. *Am J Bot*, 1998, 85(8): 1098 - 1109.

## Genetic Diversity of *Cryptocarya Chinensis* Life Stages in Dinghu Mountain, China

GAO San-hong<sup>1</sup>, WANG Zheng-feng<sup>2</sup>, ZHANG Jun-li<sup>1</sup>, TIAN Shen-ni<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Key Laboratory of Digital Botanical Garden, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Genetic diversity and population structure of *Cryptocarya Chinensis* were examined in three different life stages (adults, juveniles, seedlings) in Dinghu mountain using ISSR markers. The results indicated the level of genetic diversity of *C. chinensis* ( $H_e = 0.1090$ ) was relatively low compared with those species with similar life history, and the degree of genetic differentiation between life stages ( $G_u = 0.0890$ ,  $\phi_u = 0.0644$ ) was low. Seedlings had higher genetic diversity than adults and juveniles. We also found the increase in genetic distance from adults to seedlings. Compared with the similar life history species, *C. chinensis* has relatively low genetic diversity, which may be caused by low gene flow between populations. However, genetic differentiation might be attributed to sampling deviation.

**Key words:** ISSR; *Cryptocarya chinensis*; genetic diversity; life stages