

# 鼎湖血桐种群生物学及遗传多样性初步研究

肖 炜<sup>1,2</sup>, 王 峥<sup>1</sup>, 曹洪麟<sup>1</sup>, 叶万辉<sup>1\*</sup>, 黄国敏<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘 要:** 采用点格局分析、径级结构分析以及微卫星筛选等方法, 对鼎湖山保护区 20 hm<sup>2</sup> 永久样地中的鼎湖血桐进行了种群生物学及遗传多样性研究。结果表明: 鼎湖血桐是一种 r-对策型阳生植物, 种群年龄结构呈金字塔型; 植株受光照不足的胁迫, 种群大部分个体聚集分布于光照充足的林窗中; 通过磁珠富集法筛选出鼎湖血桐特异性微卫星引物 13 对, 其中 2 对具备多态性, 多态百分率为 15.4%, 多态信息含量在 0~0.3734 之间, 平均期望杂合度为 0.0756, 远低于同属其它植物。研究表明鼎湖血桐对环境变化的适应范围较窄, 遗传多样性较低, 应对其种质资源进行多样性评估与保护。

**关键词:** 鼎湖血桐; 点格局分析; 径级结构分析; 微卫星; r-对策; 阳生植物

**中图分类号:** Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)01-0070-05

## Population biology and genetic diversity of *Macaranga sampsonii*

XIAO Wei<sup>1,2</sup>, WANG Zheng-Feng<sup>1</sup>, CAO Hong-Lin<sup>1</sup>,  
YE Wan-Hui<sup>1\*</sup>, HUANG Guo-Min<sup>1,2</sup>

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** An analysis of population biology and genetic diversity of *Macaranga sampsonii* was taken in DHS-20-hm<sup>2</sup> permanent plots, which locates on the Dinghushan natural reserve. By use of point pattern analysis and DBH-class structure analysis, it was concluded that *M. sampsonii* was a light-dependent epy, whose population age structure was approximately pyramid-like. The population habitat was restricted in the canopy gaps because of sunlight deficiency stress. Thirteen microsatellite loci were isolated by methods of magnetic beads enrichment, in which only two loci (15.4%) were polymorphic. The polymorphic information content of these loci ranged from 0 to 0.3734. The average expected heterozygosity of *M. sampsonii* was 0.0756, which was obviously lower than other *Macaranga* species. These results indicated that *M. sampsonii* was in a narrow environment adaptation range and a low population genetic diversity. We should take measures to evaluate and protect its germplasm resource.

**Key words:** *Macaranga sampsonii*; Points pattern analysis; DBH-class structure analysis; microsatellite; r-strategy; light-dependent plant

鼎湖血桐 (*Macaranga sampsonii*) 是大戟科 (Euphorbiaceae) 血桐属 (*Macaranga*) 植物, 灌木或小乔木, 生长于海拔 200~500 m 的亚热带常绿阔叶林中, 能够适应高温湿润气候, 主要分布于我国广

东、广西以及福建西部和南部, 同时在越南北部也有分布 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1996)。鼎湖血桐具有抗风、耐盐碱、抗大气污染能力, 繁殖力较强, 是一种植被恢复、水土保持的优良树种。此

收稿日期: 2008-06-06 修回日期: 2009-02-20

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目 (KZCX2-YW-430); 国家科技支撑计划 (2008BAC39B02) [Supported by Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KZCX2-YW-430); the National Key Technology R&D Program (2008BAC39B02)]

作者简介: 肖炜 (1982-), 男, 江苏宜兴人, 硕士生, 主要从事保护生态学研究, (E-mail) xiaowei@scib.ac.cn.

\* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: why@scbg.ac.cn)

外,鼎湖血桐本身含多种极具药用价值的次生代谢物质,具备止血止痢、催吐、抗癌、止咳及消炎等多重功效(李晓花,2007),是一种优良的药用植物。目前,良好的生态功能和药用价值等特性使得血桐属植物的生物学特性研究正逐渐受到国内外的关注(Banfer等,2006;Blattner等,2001)。然而作为血桐属代表植物——鼎湖血桐的相关研究在国内外还是一片空白。本文试图探讨鼎湖血桐的种群生物学特性,并通过筛选相关微卫星遗传标记报道其遗传多样性,为其种质资源的合理开发以及保护政策的研究提供基础资料和相关科学依据。

## 1 研究地区概况

研究地点位于广东省肇庆市鼎湖山自然保护区(112°30'39"~112°33'41" E,23°09'21"~23°11'30" N),保护区较好的保存了南亚热带地带性植被——季风常绿阔叶林,具有热带向亚热带的过渡性质。保护区群落结构相对复杂,组成种类相对丰富,成为当今地球该纬度带上最具特色,也最具研究价值的地区之一(王铸豪等,1982)。2005年在保护区中心地带,建立了一个东西长400 m,南北长500 m,面积达20 hm<sup>2</sup>的永久性样地。样地海拔230~470 m,坡度30°~50°,依据BCI大样地(巴拿马巴洛科罗拉多岛)建设技术规范,中国森林生物多样性监测网络的统一调查方法,利用全站仪将20 hm<sup>2</sup>大样地划分为500个20 m×20 m的样方,样方的4个角用水泥桩作永久标记。在每个20 m×20 m的样方内用差值法细分为4个10 m×10 m和16个5 m×5 m的小样方。以大样地的西南角为坐标原点,顺序排列20 m×20 m样方的行、列号。以5 m×5 m小样方为基本单元,按顺时针挂牌标记每个胸径DBH(Diameter at breast height)≥1 cm的植株个体,并记录树种名称、胸径、坐标和生长状况等信息,建立起数据库(叶万辉等,2008)。

## 2 研究方法

### 2.1 分布格局分析

统计样地内所有鼎湖血桐个体二维空间坐标,作空间分布的点图。采用不受尺度范围影响的点格局分析法,利用Diggle函数计算种群的聚集尺度,反映种群在空间尺度上的分布格局(张金屯,2004)。

其中定义K(r)函数为:

$$K(r) = \left(\frac{A}{n^2}\right) \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{1}{W_{ij}} I_i(r_{ij}) K(i \neq j)$$

其中:n是样方内植物个体数,A是样方面积, $r_{ij}$ 为两个点(植株) $i$ 和 $j$ 之间的距离。当 $r_{ij} \leq r$ 时, $I_i(r_{ij})=1$ ;当 $r_{ij} > r$ 时, $I_i(r_{ij})=0$ 。 $W_{ij}$ 为以点 $i$ 为圆心、 $r_{ij}$ 为半径的圆周长在面积A中的比例。进一步用L(r)代替K(r): $L(r) = \sqrt{K(r)/\pi - 1}$ 。在随机分布下,L(r)在所有尺度r下均等于0;若L(r)>0,则可以认为种群在尺度r下为聚集分布;若L(r)<0,为均匀分布。

### 2.2 年龄结构分析

由于相同环境下同一树种年龄级与径级对环境的反应规律具有一致性(Frost & Rydin,2000),我们采用空间替代时间的方法划分鼎湖血桐种群,将种群按径级大小划分为7级:I级,1.0 cm≤DBH<4.0 cm;II级,4.0 cm≤DBH<7.0 cm;III级,7.0 cm≤DBH<10.0 cm;IV级,10.0 cm≤DBH<13.0 cm;V级,13.0 cm≤DBH<16.0 cm;VI级,16 cm≤DBH<21.0 cm;VII级DBH≥21.0 cm。绘制径级结构图。

### 2.3 鼎湖血桐遗传多样性研究

2.3.1 鼎湖血桐DNA的提取 用CTAB法提取新鲜叶片DNA(Doyle等,1987),0.1×TE溶解,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3.2 微卫星体筛选 微卫星(SSR)以1-6bp的短核苷酸为基本单位,呈串联重复状广布于生物体整个基因组,具有分布广泛、易于检测、进化所受选择压小、信息量大、以孟德尔方式分离、共显性遗传等特点,在遗传多样性检测、种质鉴定及系谱分析、遗传连锁图谱构建、基因定位与标记辅助育种等领域中得到广泛应用(郭大龙,2007;陈远孟等,2008)。实验采用磁珠富集法来筛选微卫星体(Hong等,2007),挑选含高度重复序列的片段,利用primer 3.0在线软件设计引物并合成,对鼎湖血桐种群进行PCR反应。反应体系:10×PCR混合缓冲液2.0 μL,dNTPs(2.5mmol/L)2 μL,微卫星上下游引物(10 μmol/L)各1 μL,Taq DNA聚合酶2 U,DNA模板(100 ng/μL)1 μL,补无菌去离子水到20 μL。反应程序为94℃变性3 min;94℃变性30 s,54~64℃复性30 s,72℃延伸30 s,35个循环;最后72℃延伸10 min。产物用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

2.3.3 遗传多样性计算 微卫星是共显性遗传,可

从凝胶电泳图谱上直接判断出个体的基因型。统计微卫星座位的等位基因数(Observed number of alleles, A)和等位基因频率 Allele Frequency, P), 并由此计算期望杂合度(He)和多态信息含量(PIC)(Botstein 等, 1980)。计算公式如下: 期望杂合度:  $H_e = 1 - \sum P_i^2$  多态信息含量计算公式如下:

$$PIC = 1 - (\sum_{i=1}^n P_i^2) - (\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j)$$

其中, n 为某一位点上等位基因数,  $P_i$ 、 $P_j$  分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率,  $j = i + 1$ 。

### 3 结果与分析

#### 3.1 分布格局

点格局分析显示 Diggle 函数  $L(r)$  在 0~20 m 的尺度格局上显著偏离随机分布的 95% 置信区间(图 1), 表明鼎湖血桐种群呈高度聚集分布状态, 平面图上用点阵标记血桐植株, 绝大部分个体集中分布在样地东南部的 3 个地势陡峭区域(图 2), 这些地区曾出现大规模的山体滑坡现象, 大量乔木倒塌或死亡, 形成面积较大的林窗。

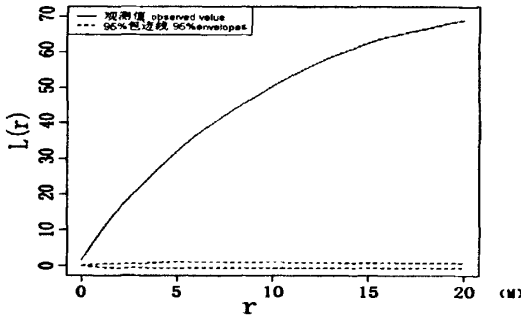


图 1 鼎湖血桐分布的点格局分析  
Fig. 1 Point pattern analysis of *M. sampsonii* distribution

#### 3.2 径级结构

径级结构分析显示鼎湖血桐种群结构呈金字塔形(图 3), I、II 级幼树个体占种群个体总数 90% 以上, 而 V、VI 级成年个体很少, 其个体数目随植株胸径增大而迅速递减, 表明血桐幼树受到了较大的环境阻力不能有效地进入成熟个体阶段。

#### 3.3 微卫星筛选及遗传多样性

测回序列去除接头及载体后, 部分微卫星序列因本身结构或侧翼序列太短不能设计引物, 其余微卫星序列用 Primer3.0 设计、合成引物 35 对。PCR 扩增结果显示, 13 对引物能扩增出清晰明亮的特异性条

带。用鼎湖血桐群体对这些引物的多态性进行评估, 结果显示扩增产物大小在 120~232 bp 之间, 仅有 2 对(15.4%)在个体间具备不同程度的多态性(图 4), 等位基因数在 1~2 之间, 多态信息含量在 0~0.3734 之间, 平均期望杂合度(He)为 0.0756(表 1)。

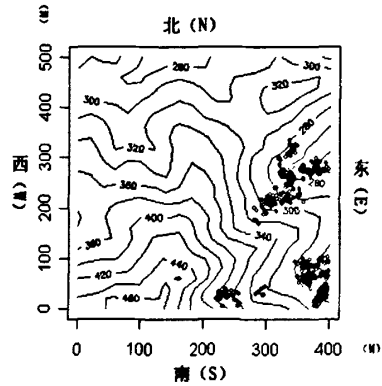


图 2 鼎湖血桐植株的二维分布图  
Fig. 2 Distribution of *M. sampsonii* individuals in two-dimensions

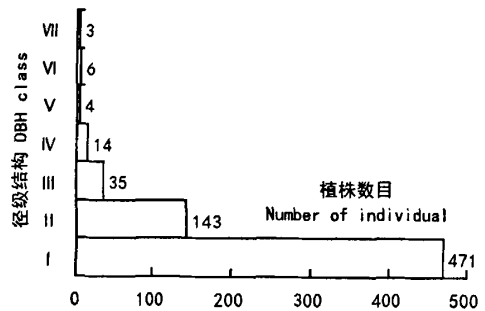


图 3 鼎湖血桐种群径级结构  
Fig. 3 The DBH-class structure of *M. sampsonii* population

### 4 讨论

自然界中大多数种群与环境之间的关系呈高斯模型(Gaussian Model), 由于种群间的竞争使种群生态位发生分移, 同种个体逐渐从适宜度较低的空间退缩, 占据环境适宜度较高的空间, 因而使得种群具有一定的聚集度(金明仕, 1992)。点格局分析表明鼎湖血桐的聚集度较高, 种群大部分个体生长于样地内山体滑坡等因素所形成的林窗中, 其他地方少有分布。而林窗与非林窗的森林底层相比, 具有较强的光照(段仁燕等, 2005), 这可能是鼎湖血桐在林窗中迅速生长的原因之一。光照条件的差异使得鼎湖血桐种群在样地中高度聚集, 以充分利用适宜

的空间资源。这些结果表明鼎湖血桐的种群分布易受光照不足的胁迫,是一种典型的阳生植物。相似分布的还有野漆树(*Toxicodendron succedaneum*)、白楸(*Mallotus paniculatus*)等树种(彭闪江等,

2003),这些植物多属于灌木和小乔木,在光照资源利用方面受到其他耐荫和中生性乔木巨大的竞争压力胁迫,生态位受到限制。

自然界中生物在生存斗争过程中采取不同的生

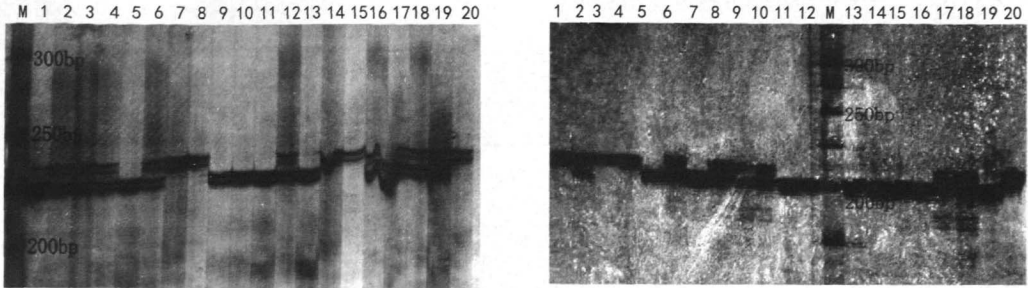


图 4 微卫星多态位点 DHXT06、DHXT25 在鼎湖血桐种群中的 PCR 扩增结果  
Fig. 4 Amplified results of *M. sampsonii* population at DHXT06 locus and DHXT25 locus

表 1 鼎湖血桐微卫星引物特性  
Table 1 Characterization of microsatellite primers of *M. sampsonii*.

座位 Locus	引物序列 Primer sequence (5'-3')	核心序列 Motifs	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物大小 Product size (bp)	等位基因数 Number of alleles(A)	多态信息含量 Polymorphic information content(PIC)	GenBank 注册号 GenBank Accession No.
DHXT04	F: acaacttgggcaaatggt R: ccaaagctatcaacct	(GT) <sub>20</sub>	62	130	1	0.0000	EU635469
DHXT06	F: gagacttttagtgggaca R: gacttaccaaatggatga	(GT) <sub>18</sub>	54	220~232	2	0.3734	EU635470
DHXT09	F: cticccttctcaattctc R: tgtggtgataatctttagc	(CA) <sub>22</sub>	56	175	1	0.0000	EU635471
DHXT10	F: gaaatcactcttctcttctc R: ggacacctaaggggcaat	(CA) <sub>20</sub>	62	120	1	0.0000	EU635472
DHXT12	F: ggggtggttaagggaata R: caagaaatcccaagga	(TG) <sub>22</sub>	56	122	1	0.0000	EU635473
DHXT17	F: tataagaggagtgaggg R: actaaggaggttgggtgtt	(GA) <sub>22</sub>	62	145	1	0.0000	EU635474
DHXT18	F: agggagtgagggttagag R: taaggaggttgggtgtcc	(GT) <sub>20</sub>	62	136	1	0.0000	EU635475
DHXT21	F: tttgattggtggtatgtgtg R: ttgaagctcccaatgcttct	(GT) <sub>12</sub>	64	214	1	0.0000	EU635476
DHXT22	F: tgtgtgattgggtggaaggtt R: agctccccaaaatctttgct	(GT) <sub>14</sub>	63	179	1	0.0000	EU635477
DHXT23	F: agaagcatttgggagcttca R: ttccagaacatcaaacaca	(GT) <sub>8</sub>	64	180	1	0.0000	EU635478
DHXT24	F: cccagtggagagcaaacctc R: tgaagtataaaatacactcacatcage	(CA) <sub>7</sub>	64	161	1	0.0000	EU635479
DHXT25	F: ggttgaatgactattgtgtga R: caactcttcttctctcaaatc	(GT) <sub>12</sub>	64	196~210	2	0.3626	EU635480
DHXT29	F: ttttgattgggtgggtgtgtg R: caaatgaggctcccaatg	(GT) <sub>10</sub>	58	223	1	0.0000	EU635481

活史对策,它包括生存适合度,能量物质分配与权衡,体型与效应以及生殖对策等内容,普通植物往往具有 r-对策与 K-对策两个方面的特征,较难分辨生活史类型(孙儒永等,2005)。径级结构分析表明鼎

湖血桐种群结构呈典型的金字塔形,种群内具有大量的血桐幼树,但由于林冠的迅速填充使得种群受到光照不足的胁迫(谭辉等,2007),存在较大的生长阻力不能有效地进入成熟个体阶段。样地内相似种

群结构的植物还有豺皮樟(*Litsea rotundifolia*)、三叉苦(*Evodia lepta*)等植物(史军辉等,2006)。这些虽是多年生植物,但繁殖力较高,生长发育较快,同时受阳光或降水等气候条件的限制,幼体存活率较低,种群分布以及大小往往随气候变异而出现较大的变化,偏向于*r*-对策生活史植物的特征。

通常,定居在林窗中的幼苗比森林底层的多,生物多样性也较丰富(Gray等,1997),然而对于某个特定物种来说,可能结果恰恰相反。微卫星遗传标记筛选结果显示鼎湖血桐种群平均期望杂合度(0.0756)远远低于同属*M. pearsonii*(0.5982)和*M. gigantea*(0.6237)等植物(Guicking等,2006)。分析原因,可能有两个方面:(1)虽然鼎湖血桐主要采取有性繁殖方式,但由于种群内成年构建个体较少,低于某个密度极限,使得鼎湖血桐种群对近交和相互之间的基因流增加极为敏感(李静等,2005;Butcher等,2005),导致种群内大部分新生幼树均为同型近交后代,具有相同的亲本来源,遗传多样性较低;(2)野外观察发现鼎湖血桐存在无性繁殖现象,部分个体根部蘖生长出新的植株,这也是种群遗传多样性偏低的一个重要原因。较低的遗传多样性使得鼎湖血桐对环境变化的适应范围较窄,需要对鼎湖血桐的种质资源进行多样性评估与保护。

实验中首次分离出鼎湖血桐这一物种的微卫星体,获得了一批特异性引物,研究成果有利于进一步阐明鼎湖血桐自然种群的遗传资源现状。目前已公布的血桐属植物微卫星序列较为缺乏,此次筛选也为同属植物的遗传多样性研究提供多对可供选择的跨种引物。

#### 参考文献:

中国科学院中国植物志编辑委员会. 1996. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社: 44(2): 053  
 孙儒泳, 李庆芬, 牛翠娟等. 2002. 基础生态学[M]. 北京: 高等教育出版社: 99-107  
 张金屯. 2004. 数量生态学[M]. 北京: 科学出版社: 272-276  
 李晓花. 2007. 三种南方民间药用植物化学成分的研究[C]. 北京: 中国科学院研究生院博士学位论文: 4-6  
 金明仕. 1992. 森林生态系统[M]. 北京: 中国林业出版社: 334-338  
 Banfer G, Moog U, Fiala B, et al. 2006. A chloroplast genealogy of myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae) in Southeast Asia reveals hybridization, vicariance and long-distance dispersals [J]. *Mol Ecol*, 15(14): 4 409-4 424  
 Blattner FR, Weising K, Banfer G, et al. 2001. Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae) [J]. *Mol Phy Evol*, 19(3): 331-344

Botstein D, White RI, Skolnich M. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 32: 314-331  
 Butcher PA, Skinner AK, Gardiner CA. 2005. Increased inbreeding and inter-species geneflow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii* [J]. *Conserv genet*, 6: 213-226  
 Chen YM(陈远孟), Zhang XJ(张向军), Chen CH(陈传华), et al. 2008. Assessment of genetic diversity of aromatic rice (*Oryza Sativa*) from Guangxi and South Asia by using SSR markers(用SSR标记分析广西香稻与南亚香稻的遗传多样性) [J]. *Guihaia*(广西植物), 28(2): 154-159  
 Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15  
 Duan RY(段仁燕), Wang XA(王孝安), Wu GL(吴甘霖). 2005. Gap disturbance and forest community succession(林窗干扰与森林群落演替) [J]. *Guihaia*(广西植物), 25(5): 419-423  
 Frost I, Rydin H. 2000. Spatial pattern and size distribution of the animal-dispersed tree *Quercus robur* in two spruce-dominated forests [J]. *Ecoscience*, 7: 38-44  
 Gray AN, Spies TA. 1997. Microsite controls on tree seedling establishment in conifer forest canopy gaps [J]. *Ecology*, 78: 2 458-2 473  
 Guicking D, Rana TS, Blattner FR, et al. 2006. Microsatellite markers for the palaeotropic pioneer tree genus *Macaranga* (Euphorbiaceae) and their cross-species transferability [J]. *Mol Ecol Notes*, 6(1): 245-248  
 Guo DL(郭大龙). 2007. Development of the microsatellite primer in plant(植物微卫星引物开发方法) [J]. *Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), 35(8): 5 361-5 363  
 Hong L, Niu HY, Shen H, et al. 2008. Development and characterization of microsatellite markers for the invasive weed *Mikania micrantha* (Asteraceae) [J]. *Mol Ecol Res*, 8(1): 193-195  
 Li J(李静), Ye WH(叶万辉), Ge XJ(葛学军). 2005. The genetic consequences of habitat fragmentation on plants(生境片段化对植物的遗传影响) [J]. *Acta Univ Sunyatseni* (Sci Nat)(中山大学学报·自然科学版), 44(2): 193-199  
 Peng SJ(彭闪江), Huang ZL(黄忠良), Zhou GY(周国逸), et al. 2003. Gap formation characteristics and its effects on sapling composition and diversity in Dinghushan biosphere reserve(鼎湖山林窗形成特征及其对幼树组成和多样性的影响) [J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 11(3): 229-235  
 Shi JH(史军辉), Huang ZL(黄忠良), Zhou XY(周小勇), et al. 2006. Vertical pattern of plant community and biodiversity on the Dinghu Mountain(鼎湖山森林群落多样性垂直分布格局的研究) [J]. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 24(10): 1 143-1 146  
 Tan H(谭辉), Zhu JJ(朱教君), Kang HZ(康宏樟), et al. 2007. A research review on forest gap disturbance(林窗干扰研究) [J]. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 26(4): 587-594  
 Wang ZH(王铸豪), He DQ(何道泉), Song SD(宋绍敏), et al. 1982. The vegetation of Ding Hu Shan Biosphere Reserve [J]. *Trop Subtrop Fore Ecosys* (热带亚热带森林生态系统研究), 1: 77-141  
 Ye WH(叶万辉), Cao HL(曹洪麟), Huang ZL(黄忠良), et al. 2008. Community diversity of Dinghushan evergreen broad-leaved forest 20 hm<sup>2</sup> plot in low subtropical, China(鼎湖山亚热带常绿阔叶林 20公顷样地群落特征研究) [J]. *J Plant Ecol* (植物生态学报), 32(2): 274-286