

## 濒危植物崖柏遗传多样性研究

张仁波<sup>1,2</sup>, 窦全丽<sup>2</sup>, 何平<sup>1\*</sup>, 邓洪平<sup>1</sup>

(1. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715; 2. 遵义师范学院 生物系, 贵州 遵义 563002)

**摘要:** 以重庆市大巴山和雪宝山的崖柏为研究对象, 对其鳞叶的形态分化进行了初步研究, 并用 RAPD 分子标记技术探讨了该物种在分子水平上的遗传变异。结果表明: 崖柏居群内和居群间均存在着广泛的表型及基因型的变异; 基于形态数据建立的崖柏居群之间的关系和基于 RAPD 数据建立的关系不相符; 空间距离和生态因子对崖柏居群进化的影响较小; 崖柏居群之间的基因流水平较低; 应对崖柏居群采取就地保护的措施。

**关键词:** 崖柏; 遗传多样性; 形态分化; RAPD 分子标记

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)05-0687-05

## Analysis of genetic diversity in *Thuja sutchuenensis* populations as revealed by morphological and molecular data

ZHANG Ren-Bo<sup>1,2</sup>, DOU Quan-Li<sup>2</sup>, HE Ping<sup>1\*</sup>, DENG Hong-Ping<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Department of Biology, Zunyi Normal College, Zunyi 563002, China)

**Abstract:** This study analyzed the morphological and molecular variations of six natural populations of *Thuja sutchuenensis* from Chongqing, China. The morphological characters of scale leaves were measured and the morphological differentiation was studied. The molecular variations were investigated by using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). Considerable genetic diversity was found among and within the *T. sutchuenensis* populations studied. Two dendrograms were independently constructed from morphological and RAPD data and the clusters resulting from each method were not congruent. Both two dendrograms showed little correlation between clusters and geographic regions, and there is little correlation between clusters and ecological factors. It suggests that geographic isolation and ecological factors have little influence on the evolution of the *T. sutchuenensis* populations. Conservation *in situ* of *T. sutchuenensis* should be carried out and the gene flow between populations should be cautiously strengthened or not.

**Key words:** *Thuja sutchuenensis*; genetic diversity; morphological differentiation; RAPD

崖柏 (*Thuja sutchuenensis*) 隶属于柏科 (Cupressaceae) 崖柏属, 是一种常绿乔木, 为我国特有。该物种在 1892 年被法国传教士首次发现, 曾被认为是已灭绝的 3 种中国特有植物之一, 1999 年又被重新发现, 现已被 IUCN 评估为世界级的极为濒危物种 (傅立国, 1991; 刘正宇等, 2000; 重庆市林业局, 2003)。崖柏能生长于石灰岩山地, 对环境条件的要

求与柏木相似 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1978)。该物种仅分布于我国重庆市东北的城口县大巴山自然保护区和开县雪宝山自然保护区 (近年来据报道在四川省万源市花萼山自然保护区和湖北省保康县五道峡自然保护区也有发现)。崖柏被重新发现以来, 易思荣等 (2001) 进行了扦插繁殖试验并获得成功, 刘建锋 (2003) 进行了居群生态学、居群

收稿日期: 2006-09-04 修回日期: 2006-12-13

基金项目: 国家自然科学基金 (30070080) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070080)]

作者简介: 张仁波 (1977-), 男, 贵州桐梓人, 硕士研究生, 主要从事植物分类学研究。

\* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail:)

结构与动态以及居群空间格局与动态等研究,唐熙等(2005)研究了崖柏木材结构的特点,李建华等(2005)研究了崖柏属的系统演化和生物地理关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 形态分化研究

在崖柏分布区,选取 6 个居群作为研究对象(图 1)。其中龙门和葛藤坝样地位于城口县的大巴山自然保护区,王家岩、回龙山、上方寨和飞龙寨样地位于开县的雪宝山自然保护区。在样地内观察其鳞叶生长特性,记录一些基本环境特征,挖取土壤。

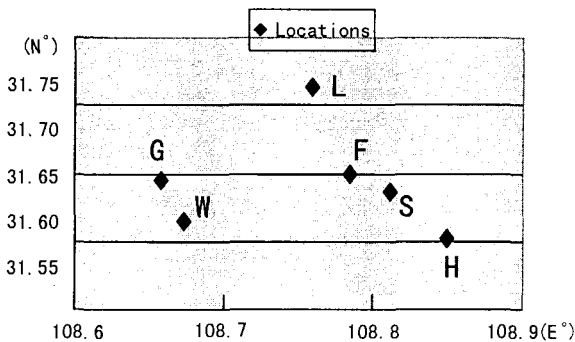


图 1 崖柏天然居群分布示意图  
Fig. 1 *Thuja sutchuenensis* populations included in the study

F:飞龙寨; G:葛藤坝; H:回龙山; L:龙门;  
S:上方寨; W:王家岩。

在每个样地内选取 13~15 株个体,每株分上、中、下三层各采集 1 个枝条。每株在老枝上用小镊子共选取 5 对较大的侧面叶,在末级枝上共选取 5 个较大的分节。用游标卡尺和电子天平分别测量老枝上的侧面叶和 5 个分节,再测量分节上的中央叶和侧面叶,分别记录 20 项指标(表 2):分节长、分节宽、分节长/宽、分节厚、分节重、中央叶长、中央叶宽、中央叶长/宽、中央叶厚、中央叶重、侧面叶长、侧面叶宽、侧面叶长/宽、侧面叶厚、侧面叶重、老枝侧面叶长、老枝侧面叶宽、老枝侧面叶长/宽、老枝侧面叶厚、老枝侧面叶重。

利用统计软件 SPSS 11.0 中的 One-Way 过程计算各形态性状在居群内的平均值并进行显著性分析。利用 Hierarchical cluster 过程对 83 个个体的 20 个性状构成的  $83 \times 20$  矩阵进行个体水平上的聚类分析;再将每个居群内个体的同一性状取几何平均值,每一居群得 20 个平均值,6 个居群得  $6 \times 20$

的矩阵,获得形态方面的统计数据 and 居群间的聚类结果。

### 1.2 RAPD 分子标记研究

在每个崖柏样地内,各选取 15 个植株,在每个植株上摘取当年生的少量幼嫩鳞叶,置于保鲜袋中,加入足够的硅胶,密封保存。带回实验室后放入  $-35^{\circ}\text{C}$  保存。

用改良的 CTAB 法进行 DNA 的提取,用核酸蛋白仪 (BIO-RAD, U. S. A) 测定 DNA 样品的浓度,参照刘建锋(2003)的方法(包括筛选的引物)在扩增仪上进行 PCR 扩增。RAPD 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶(含 GoldView 染料)电泳 ( $9\text{ V/cm}$ , 40 min) 分离,每块凝胶加上一个 200~2 000 bp 已知分子量的 DNA Marker,在凝胶成像系统 (BIO-RAD, Universal Hood II) 中拍照。图 2 为引物 A16 扩增产物的电泳分离图之一。

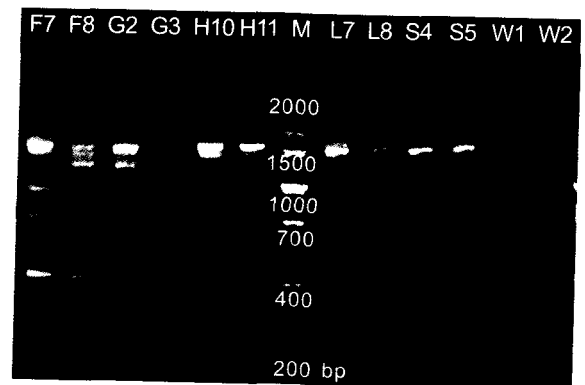


图 2 引物 A16 扩增产物的电泳分离图之一  
Fig. 2 An example of the RAPD profiles by one of the primers(A16)

M:已知分子量的标准 DNA 样品。  
M:DNA marker.

获得的 RAPD 凝胶电泳图片,采用 0(无)和 1(有)编码详细记录每个样品在各种引物上的条带,不好判断的条带记为缺失数据。获得的 0、1 数据矩阵用 POPGENE 32(Yeh 等,1997)软件进行处理,得到多态位点百分比、遗传分化系数和遗传一致度等数据和分子水平上的聚类图。

## 2 结果与分析

形态性状特征的显著性分析表明:在 20 项形态指标中有 10 项达到极显著水平(老枝侧面叶长、老枝侧面叶长/宽、老枝侧面叶重、新枝分节长、新枝分

节宽、新枝分节重、新枝中央叶重、新枝侧面叶长、新枝侧面叶厚、新枝侧面叶重), 2 项达到显著水平(新枝中央叶长和新枝中央叶宽)。其中侧面叶和新枝分节各有 3 项指标的变异达到极显著水平, 说明居群间侧面叶和新枝分节变异较大, 而中央叶变异较小。这可能是因为中央叶被侧面叶部分包被, 受外界环境条件变化的影响较小, 而侧面叶暴露在外面受环境变化影响较大, 新枝上的分节则可能是因为鳞叶比较幼嫩而容易受环境的影响。

在鳞叶生长状况方面, 以葛藤坝居群和龙门居群为好。可能的原因是: 龙门居群位于山脚, 紧靠河流, 水分条件较好。而葛藤坝居群虽然位于山腰, 但它与其它 3 个处于陡峭山脊的居群不同。该居群所处样地海拔较低, 且位于两山相夹的山谷地带, 风力较小, 夜间环境温度较高。

通过崖柏居群的形态聚类图(图 3)以及居群分布图(图 1)可以看出, 崖柏居群并非按照空间距离的远近聚在一起, 较近的居群可能隔得很远, 较远的居群反而可能聚在一起。这可能是由于形态特征容易受到环境因子的影响, 并不是真正基因型的反映。

在分子水平上, 崖柏居群也未按空间距离之间的联系聚在一起(图 4)。这可能和各个居群位于不同的生态环境有关。地理距离近的居群可能生态环境大不相同, 同样, 地理距离远的居群可能生态环境极为相似。如果在环境选择压力的作用下, 不同居群之间的分子变异可能与地理隔离联系不大。汪小全等(1996)还发现遗传变异水平与银杉居群生境的复杂程度有一定的相关性。

崖柏种内多态位点比率为 72.09%, Nei 基因多样性指数为 0.3015, Shannon 遗传多样性指数为 0.4360, 均属较高水平。虽然风媒植物大多具有很高的遗传多样性, 但考虑到其极其狭窄的分布区, 其多样性水平是非常高的。

小群体间的基因分化系数( $G_{st}$ )平均值为 0.1604, 说明小群体间的遗传分化不大。大部分遗传变异存在于居群之内(83.94%), 与风媒异交植物的遗传变异主要分布于群体内这一规律是一致的。

崖柏各居群间的遗传一致度平均值为 0.9221, 说明居群间保持了较大的基因相似度。这可能是由于以前崖柏处于连续的大居群状态, 只是由于环境的破坏和过度砍伐使其变为地理上隔离的小居群状态, 居群间基因交流被阻断的时间不是很长。

崖柏居群间的基因流( $N_m$ )平均值为 2.6177,

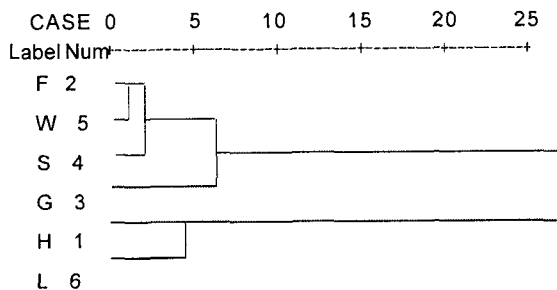


图 3 崖柏天然居群形态水平上的聚类图(SPSS 软件)

Fig. 3 Dendrogram of the natural populations of *T. sutchuenensis* by morphological characters

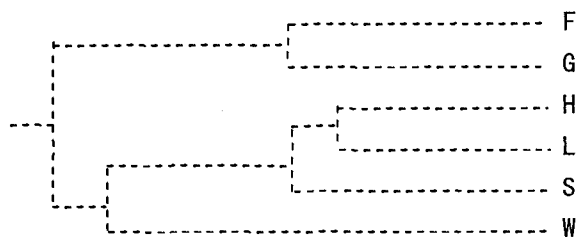


图 4 崖柏天然居群分子水平上的聚类图(POPGENE32 软件)

Fig. 4 Dendrogram of the natural populations of *T. sutchuenensis* by RAPD markers

说明居群之间的基因流水平较低。虽然王中仁(1996)认为  $N_m > 1$  时, 居群之间就有足够的基因流。但是 Hamrick 等报道了 4 种针叶树的  $N_m$  值一般在 5.3~37.8 之间(刘建锋, 2003)。相比之下崖柏居群之间的基因流明显处于较低水平。

### 3 讨论

刘建锋(2003)进行了崖柏居群生态学研究, 发现崖柏种内具有较为丰富的遗传多样性。群体内的变异占种内变异的大部分, 而群体间的遗传变异较小。崖柏群体间基因流动贫乏, 遗传漂变成为刻划群体遗传变异的主要因素。与其研究结果相比, 本文的研究结果也同样表明崖柏种内具有较为丰富的遗传多样性, 小群体间的遗传分化不大。但相比之下崖柏种内的遗传多样性水平略有下降而居群间的基因流略有上升, 这可能是由于采样地点的不完全相同和居群内植株选择的不同引起的。

Mosseler 和 Brauner 等发现濒危植物的遗传多样性普遍较低(张晗等, 2003), 而遗传多样性单一会导致适应力的下降, 一旦外界环境出现变故容易导

致物种灭绝(赵锦等,2000)。但濒危植物的遗传多样性不一定低。葛颂等(1999)研究了濒危物种裂叶沙参遗传多样性,发现该物种具有很高的遗传多样性,并未出现遗传变异性的下降。目前国内对柏科濒危植物的研究还较少(本文的研究对象属柏科),而对于相近的松科和杉科研究较多。研究发现,有的濒危松杉目植物遗传多样性较低,如银杉(葛颂等,1997)和资源冷杉(苏何玲等,2004)等,而有的濒危松杉目植物遗传多样性较高,如红皮云杉(王秋玉等,2004)和秃杉(宋丛文等,2004)等。本文的研究印证了濒危植物的遗传多样性不一定低这一观点。

致使崖柏濒危的首要因素可能是严重的人为砍伐对其直接的破坏。当有急性病因存在时,物种灭绝的原因(某种意义上来说)与遗传多样性丧失没有关系,挽救濒危物种应该首先解除物种生存所面临的确切威胁(张大勇等,1999)。环境的破坏和过度材用导致现有的崖柏居群处于岛屿状的隔离生境中。而生境的片断化又是引起植物濒危的原因之一(陈小勇等,2000)。无论根据居群遗传学理论还是生态学原理,人们都希望濒危物种在其地理分布区内维持多个相互独立的居群(张大勇等,1999)。对片断化居群的保护首先应尽快恢复居群大小,使遗传变异的丧失减少到最低程度。

生境竞争力的大小对崖柏的濒危可能有一定的影响。阔叶树种对崖柏生存的挤压可能导致其濒危。崖柏现实的分布区可能并非是其最适生境,而是一种“致危生境”,这种生境增加了居群自交、遗传多样性下降和遗传漂变的机会(张文辉等,2002)。但从传粉和基因交流这一角度来看,大多数崖柏居群所处的严酷生境又是比较适合的。陡峭的山脊地势比较开阔,所受的风力较大,传粉时在晴天容易形成花粉云进入高空,在一定的情况下降落到另一个居群中。

此外,崖柏自身的生物学特性、生活史对策以及种间杂交也可能对其濒危也起到了一定的作用。崖柏具有发育缓慢、生殖迟缓、大种子、小收获量和寿命长的特点,在一定情况下对居群的更新和扩展是不利的。

根据崖柏居群的现有状况,提出以下几点保护措施:(1)就地保护。崖柏居群有一定的自然更新能力;有的居群内幼苗数量较多;崖柏种内具有较为丰富的遗传多样性。现已建立了2个主要以崖柏为保护对象的自然保护区,已经展开宣传及保护工作。

还需进一步加强对崖柏居群生存环境的保护,防止人为破坏(在上方寨居群和飞龙寨居群中,还有直径较大的伐桩残留),使崖柏居群能安全度过瓶颈效应,恢复到大吉居群状态,从而容易保持原有的遗传结构。(2)迁地保护。崖柏的扦插繁殖试验已获得成功,通过对其进行扦插繁殖,增加崖柏个体数量,到一定程度时回归自然。(3)建立资源种质保存基因库。贮存崖柏球果等器官,保存种质资源。

崖柏居群间的基因流水平较低,说明遗传漂变成为刻划崖柏遗传结构的主要因素(刘建锋等,2003)。而小居群的遗传漂变一般被认为是物种灭绝的一个主要因素。但对于是否加强崖柏居群之间的基因交流这一问题要慎重对待。因为现有的崖柏居群内遗传变异水平较高,居群之间并未出现明显的分化,说明居群之间还是存在频繁的基因交流。崖柏属风媒植物,花粉能远距离传播,居群间基因流可以减轻片断居群间的空间隔离效应,从而增加总居群的有效居群大小,减轻小居群的近交衰退以及遗传变异的丧失(陈小勇等,2000)。如果随意加强其基因流,可能导致居群内适应各个异质性生境的特化基因消失从而降低物种的适应性。

在研究过程中得到了重庆市林业局、城口县林业局和开县林业局的大力协助,在此表示衷心感谢!

#### 参考文献:

- 王中仁. 1996. 植物等位酶分析[M]. 北京:科学出版社  
中国科学院中国植物志编辑委员会. 1978. 中国植物志(第7卷)[M]. 北京:科学出版社  
刘建锋. 2003. 我国珍稀濒危植物—崖柏居群生态学研究[D]. CNKI 学术期刊网中国优秀硕士论文全文数据库  
刘正宇,杨明宏,易思荣,等. 2000. 崖柏没有灭绝[J]. 植物杂志,3:8-9  
汪小全,邹喻苹,张大明,等. 1996. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国科学,26(5):436-441  
易思荣,黄娅. 2001. 崖柏扦插繁殖获得成功[J]. 植物杂志,5:30  
重庆市林业局. 2003. 崖柏[J]. 中国林业,22:29  
傅立国. 1991. 中国植物红皮书—稀有濒危植物(第1卷)[M]. 北京:科学出版社  
Chen XY(陈小勇). 1996. Gene flow of plants and its role in the conservation of endangered plants(植物的基因流及其在濒危植物保护中的作用)[J]. *Chinese Biodiversity*(生物多样性),4(2):97-102  
Ge S(葛颂), Wang HQ(王海群), Zhang CM(张灿明), et al. 1997. Genetic diversity and population differentiation of *Cathaya argyrophylla* in Bamian Mountain(八面山银杉林的遗传多样性和群体分化)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报),39(3):266-271

- Ge S(葛颂), Hong DY(洪德元). 1999. Studies of morphological and allozyme variation of the endangered *Adenophora lobophylla* and its widespread congener *A. potaninii* (濒危物种裂叶沙参及其近缘广布响泡沙参的遗传多样性研究)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), **26**(4):410-417
- Li JH(李建华), Xiang QP(向巧萍). 2005. Phylogeny and biogeography of *Thuja* L. (Cupressaceae), an Eastern Asian and North American disjunct genus (东亚-北美间断分布属崖柏属(柏科)的系统演化和生物地理研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **47**(6):651-659
- Song CW(宋丛文), Zhang XY(张新叶), Hu XY(胡兴宜), et al. 2004. Analysis on genetic diversity within species of *Taiwania flousiana* by RAPD (杉种内遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Hubei Fore Sci Tech* (湖北林业科技), **4**:1-4
- Su HL(苏何玲), Tang SQ(唐绍清). 2004. Genetic diversity of the endangered plant *Abies ziyuanensis* in two populations (濒危植物资源冷杉遗传多样性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(5):414-417
- Tang X(唐熙), Li ZY(李振宇), Hu YX(胡玉熹). 2005. Wood anatomy of *Thuja sutchuenensis* endemic to China (中国特有濒危植物崖柏的木材结构研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **23**(2):149-153
- Wang QY(王秋玉), Ren XQ(任旭琴), Jiang J(姜静). 2004. Genetic diversity for the provenance of *Picea koraiensis* by RAPD markers (红皮云杉地理种源遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *J Northeast Fore Univ*(东北林业大学学报), **32**(6):1-3
- Yeh F C, Young R C, Timothy B, et al. POPGENE 32. [computer program]. University of Alberta, Canada
- Zhang DY(张大勇), Jiang XH(姜新华). 1999. Progress in studies of genetic diversity and conservation biology of endangered plant species (遗传多样性与濒危植物保护生物学研究进展)[J]. *Chinese Biodiversity*(生物多样性), **7**(1):31-37
- Zhang H(张哈), Sha W(沙伟). 2003. The application of RAPD technique in studying genetic diversity (RAPD 技术在遗传多样性研究中的应用)[J]. *Guizhou Sci*(贵州科学), **21**(3):81-85
- Zhang WH(张文辉), Zu YG(祖元刚), Liu GB(刘国彬). 2002. Population ecological characteristics and analysis on endangered cause of ten endangered plant species (十种濒危植物的居群生态学特征及致危因素分析)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **22**(9):1 512-1 520
- Zhao J(赵锦), Liu MJ(刘孟军), Lu ZR(吕增仁), et al. 2000. The application of RAPD technique in studying genetic diversity of plant (RAPD 技术及在植物遗传多样性研究中的应用)[J]. *J Hebei Agric Univ*(河北农业大学学报), **23**(1):25-28

(上接第 769 页 Continue from page 769)

- Oliver DJ, Nikolau B, Wurtele ES. 2002. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses [J]. *Metabolic Engin*, **4**:98-106
- Qiu DY(邱德有), Huang LQ(黄璐琦). 2004. Metabolomics- an important part of functional genomics (代谢组学研究—功能基因组学研究的重要组成部分)[J]. *Mol Plant Breeding*(分子植物育种), **2**(2):165-177
- Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, et al. 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations [J]. *Nat Biotech*, **19**(1):45-50
- Roessner U, Willmitzer L, Fernie AR. 2001. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems: identification of phenocopies [J]. *Plant Physiol*, **127**:749-764
- Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Duforc EJ, et al. 2002. The metabolic architecture of plant cells-stability of central metabolism and flexibility of metabolic pathways during the growth cycle of tomato cells [J]. *J Bio Chem*, **277**:43 948-43 960
- Schmelz EA, Engelberth J, Tumlinson JH, et al. 2004. The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites [J]. *Plant J*, **39**:790-808
- Schnable PS, Stinard PS, Wen TJ, et al. 1994. The genetics of cuticular wax biosynthesis [J]. *Maydic*, **39**:279-287
- Soga T, Ueno Y, Naraoka H, et al. 2002. Simultaneous determination of anionic intermediate for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electro-spray ionization mass spectrometry [J]. *Analy Chem*, **744**:2 233-2 239
- Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in functional genomics era [J]. *Phytochem*, **62**:817-836
- Suzuki H, Achnine L, Xu R, et al. 2002. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, **32**:1 033-1 048
- Taylor J, King RD, Altmann T, et al. 2002. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning [J]. *Bioinform*, **18**:241-248
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, et al. 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants overexpressing a MYB transcription factor [J]. *Plant J*, **42**:218-235
- Tweendale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. 1998. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("Metabolome") analysis [J]. *J Bacteriol*, **180**(19):5 109-5 116
- Wang QJ(王全军), Wu CQ(吴纯启), Liao MY(廖明阳). 2004. Progress in research of metabonomics (代谢物组学的研究进展) [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), **13**:776-780
- Winson MK. 1997. Diffuse reflectance absorbance spectroscopy taking in chemometrics (DRASTIC). A hyperspectral FT-IR based approach to rapid screening for metabolite overproduction [J]. *Anal Chim Acta*, **348**(1-3):273-282