

管菊,李琬婷,黄晓霞,等.雌黄连木遗传多样性[J].江苏农业科学,2017,45(18):116-119.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.029

雌黄连木遗传多样性

管菊,李琬婷,黄晓霞,程小毛

(西南林业大学园林学院,云南昆明 650000)

摘要:利用 10 对扩增片段长度多态性(AFLP)引物对来自河南长葛、安阳 2 个地区 5 个不同种群的 139 份雌黄连木样品进行遗传多样性研究。结果显示,在种水平上,香农(Shannon)信息指数(I')为 0.492 7, Nei's 基因多样性指数(H_e)为 0.335 3,表明雌黄连木种群的遗传多样性处于中等水平。在研究中雌黄连木的遗传分化系数 G_{st} 为 0.150 8,由分子变异方差分析(AMOVA)显示,85.25%的变异存在于种群内,以上 2 个结果都表明:雌黄连木种群间存在较低的遗传分化,且遗传变异主要来源为种群内。基因流 N_m 为 2.814 9,表明较高的基因流可能是导致雌黄连木具有中等遗传多样性的主要原因之一。

关键词:黄连木;遗传多样性;遗传分化;AFLP

中图分类号: S567.1+90.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0116-03

黄连木(*Pistacia chinensis*)是一种高效多油的落叶植物,富含不干性油^[1],是我国解决能源危机的重要能源树种。黄连木抗性及适应性强,分布广泛,是重要的山地造林树种之一。我国部分地区有不少荒山贫瘠地,不宜耕作生产,而作为重要生物质能源的黄连木具有广阔的种植空间^[2]。同时,黄连木富含黄酮类、单宁、萜类及不饱和脂肪酸等生物活性成分,不仅可供食用,且是重要的药用和材用树种^[3]。目前,黄连木的繁殖一般只能依靠种播,作为雌雄异株、以种子为重要利用部分的能源植物,黄连木雌株也就具有最直接的经济价值^[4],因此,研究雌黄连木遗传多样性显得尤为重要。

在众多的分子遗传标记中,扩增片段长度多态性(AFLP)指纹标记技术具有稳定高效、方便可靠、无需预先知道基因信息等特点,在物种资源管理和种群遗传多样性以及其他研究领域占有非常重要的地位^[5-6]。本研究以河南省安阳市、长葛市 2 个地区共 5 个地点所采集的雌黄连木为试验材料,首次采用 AFLP 标记技术,对其种群的遗传关系进行研究,从而明确不同区域雌黄连木资源的遗传多样性水平和种群结构,以研究其变化规律,为将来雌黄连木种质鉴定、分类地位的确立提供科学依据,同时也为黄连木良种选育及广泛推广种植奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

本试验所采用的材料为 2015 年 3 月中旬在河南省安阳市、长葛市 2 个地区共 5 个地点采集的雌黄连木嫩叶,将不同

地点的试验材料作为 1 个种群处理,取样地点分别在长葛市和安阳市的南沟村(西沟北坡)、南沟(东后凹)、南沟(西后凹)、安阳监狱,各个种群分别采样 59、16、14、20、30 株,共 139 株个体,每株个体随机采其嫩梢,单株取样个体间间距保证在 30 m 以上,取样后存入有硅胶干燥剂的自封袋中干燥保存。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 提取雌黄连木基因组 DNA 的方法为十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)改良法^[7],并适当修改。取雌黄连木干燥嫩叶 6 g,用液氮迅速研磨成粉,加入 600 μ L CTAB 提取液以及少量聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、15 μ L β -巯基乙醇。摇匀后,迅速放入 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 45 min。后加入等体积三氯甲烷+异戊醇(体积比 24:1),上下颠倒混匀,离心 16 min,取上清液,再加入等体积三氯甲烷+异戊醇(体积比 24:1),摇匀离心 16 min。取上清液,加入 10 μ L RNase A 酶。检测 DNA 质量用 1% 琼脂糖凝胶,检测后将剩余 DNA 稀释为 50 ng/ μ L,放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

1.2.2 雌黄连木 AFLP 反应体系 AFLP 反应体系参考程小毛等的方法^[8],于 Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems)上进行。

1.2.2.1 酶切 每个反应总体积为 25 μ L,其中包括 150 ng DNA,2.5 U *Eco* R I,1.5 U *Mse* I,2.5 μ L 10 \times Tango buffer,加 ddH₂O 至 12.5 μ L。反应程序:37 $^{\circ}$ C 5 h,65 $^{\circ}$ C 2 h,85 $^{\circ}$ C 20 min。

1.2.2.2 连接 酶切后,每个 DNA 样品中加入 12.5 μ L 连接混合液(各 5 μ L *Eco* R I、*Mse* I 接头,0.75 U T₄ DNA 连接酶,2.5 μ L 10 \times T₄ Buffer,加 ddH₂O 至 12.5 μ L)。反应程序:22 $^{\circ}$ C 3 h,65 $^{\circ}$ C 10 min,反应结束后将产物稀释 5 倍待用。

1.2.2.3 预扩增 取 5 μ L 连接稀释后的 DNA 样品,各加入 20 μ L 预扩增混合液,含 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer(Mg²⁺),2 μ L 2.5 μ mol/L dNTP,1 μ L 10 μ mol/L primer,0.2 μ L *Taq* DNA 聚合酶,14.3 μ L ddH₂O。混匀后,按以下程序进行反应:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,25 个循环;

收稿日期:2017-03-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560217);国家林业局西南风景园林工程技术研究中心建设项目;云南省高校重点建设学科(风景园林学)建设项目。

作者简介:管菊(1991—),女,云南宣威人,硕士研究生,主要从事园林植物研究。E-mail:630958865@qq.com。

通信作者:程小毛,博士,副教授,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:30375713@qq.com。

72 °C 5 min。将预扩增产物稀释 20 倍备用。

1.2.2.4 选择性扩增 取 2 μL 预扩增稀释混合液,各加入 8 μL 选择性扩增混合液[1.0 μL 10 \times PCR Buffer (Mg^{2+}), 0.8 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 0.8 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ primer, 0.1 μL 5 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶,加 ddH₂O 至 8 μL]。混匀后,按以下程序反应:95 °C 3 min;94 °C 30 s,65 °C 30 s,72 °C 1 min,13 个循环;95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,23 个循

环;72 °C 5 min;95 °C 5 min,结束后立刻用冰浴冷却待用。

AFLP 引物与接头序列见表 1。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测 PCR 产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,参照程小毛等的方法^[9]进行银染显色,流水冲洗干净,置于室内自然干燥后,在灯箱上拍照记录并分析相关数据。

表 1 引物和接头序列

接头与引物名称	序列(5'→3')	接头与引物名称	序列(5'→3')
<i>Eco</i> R I 接头 1	CTCGTAGACTGGGTACCC	<i>Mse</i> I 接头 1	GACGATGAGTCTCTGAG
<i>Eco</i> R I 接头 2	AATTGGTACGCAGTC	<i>Mse</i> I 接头 2	TACTCAGGACTCAT
EA	GACTGCGTACCAATTCA	MC	GATGAGTCTGAGTA AC
EA11	GACTGCGTACCAATT CACC	MC1	GATGAGTCTGAGTA ACAA
EA12	GACTGCGTACCAATT CACG	MC5	GATGAGTCTGAGTA ACTA
EA13	GACTGCGTACCAATT CAGA	MC8	GATGAGTCTGAGTA ACTG
EA15	GACTGCGTACCAATT CAGC	MC9	GATGAGTCTGAGTA ACCA
EA16	GACTGCGTACCAATT CAGG	MC10	GATGAGTCTGAGTA ACCT
		MC12	GATGAGTCTGAGTA ACCG
		MC14	GATGAGTCTGAGTA ACGT
		MC15	GATGAGTCTGAGTA ACGC

1.3 带型统计与数据分析

使用人工读带的方法,将基因型转化成数字矩阵,在同一水平线上,把电泳图上较清晰的条带记为“1”,同一位置不存在条带或有不易分辨的弱带记为“0”。采用 POPEGENE version1.31 进行分析和计算雌黄连木遗传多样性相关参数^[10];使用分子变异方差分析(AMOVA)软件分析其遗传分化及遗传结构^[11]。

2 结果与分析

2.1 雌黄连木 AFLP 遗传多样性分析

利用 EA11MC1 ~ EA11MC15、EA12MC1 ~ EA12MC15、

EA13MC1 ~ EA13MC15、EA15MC1 ~ EA15MC15、EA16MC1 ~ EA16MC15 引物组合的方式对雌黄连木基因池进行扩增。筛选出 10 对条带清晰的引物组合,对 5 个不同地区的总计 139 份黄连木雌株的 DNA 样品进行遗传多样性研究。表 2 显示:10 对引物的香农指数(*I*)最大为 0.608 6(EA11 - MC14),最小为 0.284 6(EA13 - MC12),平均值为 0.492 7;观测等位基因数(*N_a*)最大值为 2.000 0 个,最小值为 1.666 7 个,平均值为 1.876 0 个;有效等位基因数(*N_e*)最大为 1.772 8 个(EA11 - MC14),最小值为 1.342 8 个(EA13 - MC12),平均值为 1.592 6 个;Nei 基因多样性指数 *H_e* 最大值为 0.422 5(EA11 - MC14),最小值为 0.190 6,平均值为 0.335 3。

表 2 黄连木种群的 AFLP 多样性参数

引物组合	样本数 (份)	观测等位基因数 <i>N_a</i> (个)	有效等位基因数 <i>N_e</i> (个)	Nei 基因多样性指数 <i>H_e</i>	香农指数 <i>I</i>
EA11 - MC14	139	2.000 0	1.772 8	0.422 5	0.608 6
EA11 - MC1	139	2.000 0	1.598 7	0.358 2	0.536 7
EA13 - MC10	139	2.000 0	1.722 7	0.402 4	0.585 8
EA13 - MC5	139	2.000 0	1.693 7	0.394 3	0.577 7
EA12 - MC15	139	1.666 7	1.466 6	0.258 0	0.376 6
EA16 - MC8	139	1.916 7	1.667 0	0.369 2	0.537 2
EA16 - MC12	139	1.916 7	1.663 0	0.366 7	0.538 5
EA15 - MC9	139	2.000 0	1.510 2	0.307 6	0.473 1
EA13 - MC12	139	1.578 9	1.342 8	0.190 6	0.284 6
EA13 - MC8	139	1.916 6	1.601 5	0.385 9	0.558 7
平均		1.876 0	1.592 6	0.335 3	0.492 7

通过对 2 个地区 5 个雌黄连木种群的遗传多样性分析显示,在种群水平上长葛地区和安阳监狱雌黄连木种群的几项遗传多样性指数均高于其他种群。5 个种群的平均遗传多样性指数分别为 *N_a* = 1.173 2, *N_e* = 1.482 4, *H_e* = 0.273 2, *I* = 0.401 0(表 3)。

Nei's 多样性指数 *H_e* 可以显示各个种群的变异程度,由表 3 可见,长葛地区雌黄连木种群变异程度最高(0.338 8),

南沟(西后凹)的种群变异程度最低(0.224 6)。从遗传多样性指数来看,长葛地区遗传多样性水平最高(*N_a* = 1.860 5, *N_e* = 1.594 4, *H_e* = 0.338 8, *I* = 0.496 6);南沟(西后凹)最低(*N_a* = 0.162 02, *N_e* = 1.388 3, *H_e* = 0.224 6, *I* = 0.333 6)。

2.2 雌黄连木遗传分化

雌黄连木不同种群的遗传分化程度见表 4,所得数据经 POPGEN 分析表明,本试验中所调查的 5 个雌黄连木种群的

表3 雌黄连木不同种群遗传多样性指数

种群	样本数 (份)	观测等位基因数 N_a (个)	有效等位基因数 N_e (个)	基因多样性指数 H_e	香农指数 I
安阳南沟(东后凹)	14	1.581 4	1.440 2	0.224 8	0.328 3
安阳南沟村(西沟北坡)	16	1.697 7	1.472 9	0.264 1	0.386 6
长葛市	59	1.860 5	1.594 4	0.338 8	0.496 6
安阳监狱	30	1.806 2	1.556 0	0.313 9	0.459 9
安阳南沟(西后凹)	20	1.620 2	1.388 3	0.224 6	0.333 6
平均		1.713 2	1.482 4	0.273 2	0.401 0

总基因多样性(H_t)为0.321 8,种群内基因多样性(H_s)为0.273 3,种群间遗传分化系数(G_{st})为0.150 8,表明雌黄连木种群间分化程度属中度^[12]。这与 AMOVA 的分析结果一致,即遗传变异的 85.25% 发生在种群内,种群间占 14.75%。以

上二者结论都表明,雌黄连木遗传变异主要发生在种群内。种群间的遗传分化在 0.001 水平上达到显著水平,种群间基因流 N_m 为 2.814 9 ($N_m > 1$),说明种群间基因流水平较高,遗传分化较小。

表4 雌黄连木不同种群的遗传分化

POPGEN				AMOVA	
Nei's 总基因多样性 H_t	种群内基因多样性 H_s	种群间遗传分化系数 G_{st}	种群间基因流 N_m	种群间	种群内物种水平
0.321 8	0.273 3	0.150 8	2.814 9	0.147 5 ($P < 0.001$)	0.852 5 ($P < 0.001$)

2.3 雌黄连木遗传距离与相似度

通过对不同种群的雌黄连木的遗传距离与相似度分析可知,遗传距离最小的为长葛种群和安阳监狱种群,遗传距离最大为南沟(东后凹)种群和南沟(西后凹),范围在 0.041 2 ~

0.126 9 之间。遗传相似度最高的为长葛种群和安阳监狱种群,最低的为南沟(东后凹)种群和南沟(西后凹)种群,遗传相似度范围在 0.880 8 ~ 0.959 6 之间(表 5)。

表5 不同雌黄连木的遗传距离(左下方)与相似度(右上方)

地点	南沟(东后凹)	南沟村(西沟北坡)	长葛	安阳监狱	南沟(西后凹)
南沟(东后凹)	1.000 0	0.928 9	0.899 4	0.892 4	0.880 8
南沟村(西沟北坡)	0.073 8	1.000 0	0.933 2	0.934 6	0.895 3
长葛	0.106 1	0.069 2	1.000 0	0.959 6	0.923 9
安阳监狱	0.113 8	0.067 6	0.041 2	1.000 0	0.935 6
南沟(西后凹)	0.126 9	0.110 6	0.079 1	0.066 6	1.000 0

3 讨论

基因变异,即遗传资源基因的丰富程度,是生物遗传多样性的最直接的表现形式。本研究利用 10 对 AFLP 引物对河南省 2 个地区 5 个不同种群遗传多样性进行了分析,由结果可知: $I=0.492 7$ 、 $N_e=1.592 6$ 、 $H_e=0.335 3$,这个结果表明,黄连木雌株遗传多样性处于中等水平,与王超等利用随机扩增微卫星多态性(RAMP)对黄连木进行遗传多样性研究的结果($I=0.380 3$)^[13]和吴志庄等利用简单重复序列(SSR)对黄连木天然种群遗传多样性的研究结果($H_e=0.472$)^[14]相近;而低于郝丽娟利用 SSR($H_e=0.545 8$)对黄连木天然种群遗传多样性的研究结果^[15]。导致 AFLP、SSR 标记结果存在差异的原因可能有以下几点:(1)这 2 种分子标记技术的靶位点不相同,灵敏度不同,在分析过程中检测到的遗传信息不在同一位点,故导致结果不一致,但对于未知基因,AFLP 技术检测位点多,获得更强的多态信息,结果更为准确^[15];(2)经过长期人工栽培,由于人工或自然选择等因素使得雌黄连木产生了许多变异,从而使单纯雌株的遗传多样性低于整个物种;(3)研究对象的取材地点和方法不一样,造成结果有差异。在种群水平上,不同的黄连木雌株种群内遗传多样性水平也呈现出一定的差异。5 个种群中中葛地区的遗传多样性最高,而南沟(东后凹)种群多样性则最低。造成该结果的原因可能是各个种群所在地点不同,所存在的生态因子有一定

差异,从而造成种群间遗传多样性有差异。

遗传分化,即遗传结构变异的分布格局的差异,是遗传多样性的重要体现, G_{st} 值是反映种群进化历史的重要指标,基因流 N_m 则是影响遗传结构均质化的重要因子。在本研究中,5 个不同黄连木雌株种群之间的遗传分化系数 $G_{st}=0.150 8$,所以种群间变异程度为 15.08%,种群内遗传变异程度为 84.92%。该结果与众多风媒传粉的树种变异模式一致^[16]。本研究由 G_{st} 计算的种群间基因流 N_m 为 2.814 9,可能发挥均质化作用^[17],使得黄连木种群间遗传分化程度较低。

参考文献:

- [1] 宋双红,陈康健,王喆之. 黄连木果油制备生物柴油的应用研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2013,41(6):63-67.
- [2] 王秀玲,程序,谢光辉,等. NaCl 胁迫对甜高粱发芽期生理生化影响[J]. 生态环境学报,2010,10(5):2285-2290.
- [3] 查茜,姜卫兵,翁忙玲. 黄连木的园林特性及其开发利用[J]. 江西农业学报,2010,22(9):56-59.
- [4] 马丽媛,齐国辉,李保国,等. 黄连木雌、雄株内源植物激素和激素 POD 同工酶的比较[J]. 植物科学学报,2013,31(3):297-303.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21):4407-4414.

刘海荣,高一丹,王 葳. 天津市5种常绿灌木的综合评价[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):119-122.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.030

天津市5种常绿灌木的综合评价

刘海荣,高一丹,王 葳

(天津农学院,天津 300384)

摘要:以天津市5种常绿灌木为研究对象,通过测定5种植物的滞尘量、计算空气污染耐受指数(APTI),结合生物学特征、生态效益和经济价值等对这5种植物进行综合评价。结果表明:5种常绿灌木单位叶面积滞尘量最大的是大叶黄杨,为 1.41 mg/cm^2 ;其次是小叶黄杨,为 1.19 mg/cm^2 ;再次是沙地柏,为 0.66 mg/cm^2 ;小龙柏为 0.53 mg/cm^2 ;滞尘量最小的是凤尾兰,为 0.46 mg/cm^2 。5种植物 APTI 值由大到小依次为凤尾兰、小叶黄杨、小龙柏、沙地柏、大叶黄杨。植物综合评价结果凤尾兰为非常好,沙地柏为好,小叶黄杨、大叶黄杨、小龙柏为一般。

关键词:空气污染; APTI; 常绿灌木; 综合评价

中图分类号: X51; S687.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0119-04

随着城市化进程的加快、工业化发展、汽车尾气排放量增多,大气污染对生物以及环境造成严重的影响,其中颗粒物污染已成为主要的城市环境问题之一。颗粒物因其影响大气能见度、产生光化学烟雾、加剧温室效应^[1],而且含有重金属、细菌、病毒等致病物质,严重影响人民健康^[2]。近年来,华北地区日益严重的雾霾天气,使人们的生产生活受到了极大的影响^[3],如何减少雾霾天气的发生以及雾霾对人们生产生活的影 响,已经成为国内外公众、政府和学者共同关注的重要问题。已有研究表明,植物可以吸滞大气颗粒物,减少雾霾对环境的影响^[4],其中常绿植物由于四季常绿能够发挥更大的作用^[5]。本研究选择天津市常见的5种常绿灌木,分别为大叶

黄杨(*Buxus megistophylla*)、沙地柏(*Sabina vulgaris*)、小龙柏(*Sabina chinensis* var. *chinensis*)、凤尾兰(*Yucca gloriosa*)、小叶黄杨(*Buxus sinica* var. *parvifolia*)作为研究对象,通过比较这几种植物的滞尘能力、空气污染耐受指数(APTI)以及生物学特性、社会经济学价值等几个方面,对这几种植物进行综合评价,以期对天津市常绿植物的选择与应用提供参考,同时也为植物综合评价提供有效可行的方法。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

天津地处北温带,位于中纬度亚欧大陆东岸,主要气候特征是四季分明,春季多风,干旱少雨;夏季炎热,雨水集中;秋季气爽,冷暖适中;冬季寒冷,干燥少雪。年平均气温约为 $14\text{ }^{\circ}\text{C}$,年平均降水量在 $360\sim 970\text{ mm}$ 。

1.2 研究方法

1.2.1 材料及样品采集 当降雨量大于 15 mm ,降水强度达 10 mm/h 时或风速大于 17 m/s 时,认为植物叶片上的降留 $\text{PM}_{2.5}$ 等大气颗粒物被洗刷干净,然后重新滞留 $\text{PM}_{2.5}$ 等大

收稿日期:2016-03-16

基金项目:国家级星火计划项目(编号:2015GA610023);天津市农委项目(编号:201502100);国家级大学生创新创业训练计划(编号:201510061008)。

作者简介:刘海荣(1982—),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士,讲师,主要研究方向为园林植物应用。E-mail:53447047@qq.com。

[6]邱 芳,伏健民,金德敏,等. 遗传多样性的分子检测[J]. 生物多样性,1998,6(2):143-150.

[7]Doyle J J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin,1987,19(1):11-15.

[8]程小毛,岳 琳,黄晓霞. 基于 AFLP 标记技术的三翅槭与三角枫亲缘关系分析[J]. 中国农学通报,2011,27(16):79-83.

[9]程小毛,陈自兰,王 华. 茶树 EST-SSRs 在山茶科植物中的通用性研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(13):7596-7598.

[10]Yeh F C, Yang R. POPGENE (Version 1.31): population genetic analysis software[Z]. University of Alberta and Tim Boyle Center for International Forestry Research. Edmonton, Alberta, Canada, 1999.

[11]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(2):479-491.

[12]Wright S. Evolution and the genetics of populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1977.

[13]王 超,路丙社,白志英,等. 不同种源黄连木遗传多样性研究[J]. 华北农学报,2010,25(增刊1):55-59.

[14]吴志庄,张志翔,汪泽军,等. 黄连木居群遗传多样性的 SSR 标记分析[J]. 应用与环境生物学报,2010,16(6):803-806.

[15]郝丽娟. 能源植物黄连木遗传多样性的 SSR 及 ISSR 分析[D]. 北京:北京林业大学,2011.

[16]Baraket G, Chatti K, Saddoud O, et al. Comparative assessment of SSR and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of fig, *Ficus carica* L., genetic resources in Tunisia[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2011, 29(1):171-184.

[17]Huang H Q, Duan Q, Jiang T, et al. Studies on genetic transformation of fresh-cut chrysanthemum using DREB1A promoted by stress-induced promoter rd29A [J]. Agricultural Biotechnology, 2014, 3(2):7-9.