

李琬婷,黄晓霞,程小毛. 雄黄连木遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):133-136.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.032

# 雄黄连木遗传多样性

李琬婷,黄晓霞,程小毛

(西南林业大学园林学院/国家林业局西南风景园林工程研究中心,云南昆明 650224)

**摘要:**选取雄黄连木(*Pistacia chinensis* Bunge)为研究材料,利用 10 对扩增片段长度多态性(AFLP)引物对来自河南省的 6 个不同种群总计 136 份雄黄连木个体进行遗传多样性分析,从不同层次揭示其变异规律以及为后期黄连木雌雄鉴定和合理利用提供理论依据。结果表明,物种水平上,Shannon 信息指数  $I$  (0.49)和基因多样性指数(0.33)均反映出雄黄连木种群具有中等遗传多样性水平。分子方差分析(AMOVA)结果表明,雄黄连木种群内的遗传变异占 93.35%,种群间的变异占 6.65%,二者都说明该地区黄连木的遗传变异主要发生在种群内部。6 个黄连木群体间的遗传距离范围在 0.035 3~0.149 5 之间,遗传相似性的范围在 0.861 1~0.965 3 之间,基因流  $N_m$  为 2.612 6,说明黄连木不同群体间相似程度较高,遗传分化较低,基因交流较充分。

**关键词:**黄连木;AFLP;遗传变异;遗传分化

**中图分类号:** S792.990.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)23-0133-04

黄连木(*Pistacia chinensis* Bunge)系漆树科(Anacardiaceae)黄连木属(*Pistacia*)落叶乔木,雌雄异株,是广泛分布于我国

的生物能源树种之一<sup>[1]</sup>。在能源危机日益加剧的今天,对生物柴油能源植物进行利用研究具有极其重要的价值与意义,黄连木作为一种优良的木本油料树种,显示出其广阔的开发利用前景,受到广泛的关注<sup>[2-3]</sup>。对于雌雄异株植物而言,一般雄株生长得更快且有更好的适应性<sup>[4]</sup>,通过对雌雄黄连木的合理搭配,来满足当前对黄连木种群大面积繁育的需要,雌雄植株黄连木性别发育很难通过形态学特征来进行鉴别,故对雄黄连木进行遗传多样性研究具有极高价值。由于过去对黄连木的研究相对落后,主要集中于栽培管养<sup>[5]</sup>、病虫害防治<sup>[6]</sup>、生理特性<sup>[7]</sup>以及资源分布<sup>[8]</sup>等方面,有关其雌雄植株

收稿日期:2018-08-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31100292);云南省自然科学基金(编号:2010ZC267);云南省省级重点学科园林植物与观赏园艺建设经费(编号:50097401)。

作者简介:李琬婷(1993—),女,云南昆明人,硕士,主要从事园林植物应用研究。E-mail:2861283663@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。

表 5 各指标的二因素互作效应方差分析

因变量	变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
产量	回归	650 658 347.27	5	130 131 669.45	0.800 5	0.602 0
	残差	650 281 652.72	4	162 570 413.18		
	总变异	1 300 940 000.00	9			
番茄红素含量	回归	190.64	5	38.13	0.932 7	0.542 0
	残差	163.52	4	40.88		
	总变异	354.16	9			
糖酸比	回归	24.28	5	4.85	6.196 7	0.050 7
	残差	3.14	4	0.78		
	总变异	27.41	9			
WUE	回归	988.67	5	197.74	8.130 0	0.032 0
	残差	97.38	4	24.35		
	总变异	1 086.05	9			
PFP	回归	749.76	5	158.95	2.471 5	0.200 7
	残差	257.26	4	64.31		
	总变异	1 052.02	9			

[5]吴雪,王坤元,牛晓丽,等. 番茄综合营养品质指标构建及其对水肥供应的响应[J]. 农业工程学报,2014,31(7):119-127.

[6]王文娟,王铁良,李波,等. 小管出流灌溉方式下日光温室番茄水分生产函数模型研究[J]. 北方园艺,2012(3):40-42.

[7]吴泳辰,韩国君,陈年来. 调亏灌溉对加工番茄产量、品质及水分利用效率的影响[J]. 灌溉排水学报,2016,35(7):104-107.

[8]潘红霞,付恒阳,王建莹. 不同水分胁迫和覆盖方式对番茄产量和水分利用效率的影响[J]. 灌溉排水学报,2016,35(1):42-46.

遗传多样性或遗传改良的研究国内尚未见报道,李琬婷等利用 9 对 AFLP 引物对河南省 4 个不同种群黄连木材料进行遗传多样性分析,研究结果表明黄连木 4 个不同种群遗传多样性均处于中等水平,黄连木总的遗传分化主要来自居群内部,较低遗传分化则在其居群间存在<sup>[9]</sup>。

在随机扩增多态性标记(RAPD)和限制性片段长度多态性(RFLP)基础上不断完善发展的分子技术-扩增片段长度多态性(AFLP)标记技术,兼备 RAPD 与 RFLP 技术双重优点,可在不预知基因组序列情况下,对基因组多态性进行检测,不仅易于标准化,且所检出的多态位点同 RAPD 标记一样可覆盖整个基因组,也具 RFLP 同样的可靠性及稳定性<sup>[10]</sup>。该项技术发展至今已成功用于多种植物遗传多样性、高密度遗传图谱构建以及分子标记筛选的研究。随着分子技术的不断进步完善,AFLP 技术已广泛应用于植物种质资源鉴定、遗传多态性检测、遗传图谱构建以及群体遗传结构分析等诸多方面,不仅应用在小麦、水稻、玉米等主要农作物上,在林木、果树及蔬菜等植物上也得到广泛利用<sup>[11-14]</sup>。程小毛等应用 AFLP 技术对 6 个居群的滇西北玉龙雪山不同海拔川滇高山栎进行遗传多样性分析,结果表明,6 个居群的遗传多样性水平随海拔梯度的变化而呈现相同的变化规律<sup>[15]</sup>。魏朔南等通过 8 对引物组合将陕西漆树 8 个品种和 6 个野生居群的 14 个样品完全区分开<sup>[16]</sup>。本研究通过采用 AFLP 技术对河南省不同地域雄黄连木进行遗传多样性分析,从而为了解不同地理地域对雄黄连木遗传多样性和亲缘关系的影响,揭示其变异规律以及后期雌雄黄连木鉴定和合理利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为雄黄连木植株,于 2015 年 3 月在我国河南省长葛市和安阳市南沟村(西沟北坡)、南沟、南沟(东后凹)、南沟村(陈家沟)以及安阳监狱共 6 个地点进行采集,采集数分别为 23、32、12、18、17、34 株,共计 136 株。每株采其嫩梢 1~5 个嫩枝,且取样点间距≥30 m。将采集样品迅速放进变色硅胶进行干燥处理,带回实验室常温保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 雄黄连木 DNA 抽提 采用改良 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法<sup>[17]</sup>提取雄黄连木基因组总 DNA。

1.2.2 雄黄连木 AFLP 分析 参照李琬婷等的反应体系及

反应程序<sup>[9,18]</sup>,进行 AFLP 相关分析。选择性扩增引物编号及序列见表 1。

表 1 AFLP 选择性扩增引物编号及序列

引物编号	E + (5' - 3')	M + (5' - 3')
EA11MC1	ACC	CAA
EA11MC14	ACC	CGT
EA12MC15	ACG	CGC
EA13MC5	AGA	CTA
EA13MC8	AGA	CTG
EA13MC10	AGA	CCT
EA13MC12	AGA	CCG
EA15MC9	AGC	CCA
EA16MC8	AGG	CTG
EA16MC12	AGG	CCG

注:E +、M + 分别表示 *Eco*R I、*Mse* I 核心碱基序列与特异酶切序列。

1.2.3 带型统计与数据分析 采用人工读带法,将凝胶电泳图上难以分辨的弱带或无带记作“0”,同一位置的清晰条带记作“1”,据此构建原始数据矩阵。利用 POPEGENE Version1.31 软件进行综合分析,计算有效等位基因数( $N_e$ )、等位基因数( $N_a$ )、香农(Shannon)指数( $I$ )、遗传分化系数( $G_{st}$ )、*Nei*'s 多样性指数( $H_e$ )、基因流( $N_m$ )以及遗传距离( $D$ )等相关参数。采用 AMOVA 软件分析样品遗传变异在群体内与群体间的分布。

2 结果与分析

2.1 雄黄连木遗传多样性分析

利用 EA16MC8、EA16MC12、EA15MC9、EA13MC5、EA13MC8、EA13MC10、EA13MC12、EA12MC15、EA11MC1、EA11MC14 这 10 对筛选出的 AFLP 引物组合,对来自 6 个不同雄黄连木种群的 136 株样品进行遗传多样性分析。研究结果(表 2)表明,10 对引物的有效等位基因数( $N_e$ )变异区间在 1.28(EA13/MC12)~1.70(EA16/MC8),变幅为 0.42,平均值为 1.56;香农指数( $I$ )最大的位点是 EA16/MC8,为 0.58,最小的是 EA13/MC12,为 0.26,平均值为 0.49;而 *Nei*'s 基因多样性指数( $H_e$ )的变化范围在 0.17(EA13/MC12)~0.39(EA16/MC8),AFLP 检测的结果说明雄黄连木种质资源具有中等水平的遗传多样性。

表 2 雄黄连木遗传多样性指数

引物编号	观测等位基因数	有效等位基因数	<i>Nei</i> 's 基因多样性指数	Shannon 指数
EA13MC5	2.00	1.49	0.30	0.46
EA16MC8	2.50	1.70	0.39	0.58
EA13MC12	1.90	1.28	0.17	0.26
EA13MC8	2.00	1.56	0.34	0.52
EA12MC15	2.00	1.64	0.37	0.55
EA11MC1	2.00	1.61	0.35	0.53
EA11MC14	1.92	1.61	0.35	0.52
EA15MC9	2.00	1.66	0.38	0.55
EA16MC12	2.00	1.58	0.34	0.52
EA13MC10	2.00	1.49	0.30	0.47
平均	2.03	1.56	0.33	0.49

2.2 不同种群雄黄连木遗传多样性分析

由表 3 可知,长葛地区的种群遗传多样性水平相对其他地区较高,各项指数值均高于其他地区采样数值。其中,Nei's 基因多样性指数( $H_e$ )长葛最高为,0.30,安阳监狱最低,为 0.24;有效等位基因数( $N_e$ )从高到低依次是长葛(1.53) > 南沟(1.47) > 南沟(东后凹)(1.46) > 南沟村(陈家沟)(1.44) > 南

沟村(西沟北坡)(1.43) = 安阳监狱(1.43);观测等位基因数也是长葛最大,安阳监狱最小。在群体水平上,香农指数( $I'$ )平均值为 0.39,Nei's 基因多样性指数( $H_e$ )平均值为 0.27,表明 6 个不同种群的雄黄连木具有中等水平的遗传多样性,其中长葛种群相对于其他种群具有较高的遗传多样性。

表 3 不同种群雄黄连木遗传多样性

种群	样本数	观测等位基因数	有效等位基因数	Nei's 基因多样性	Shannon 信息指数
南沟村(西沟北坡)	23	1.78	1.43	0.26	0.39
南沟	32	1.80	1.47	0.27	0.41
南沟(东后凹)	12	1.66	1.46	0.26	0.38
南沟村(陈家沟)	18	1.69	1.44	0.26	0.38
安阳监狱	17	1.64	1.43	0.24	0.36
长葛	34	1.81	1.53	0.30	0.45
平均	—	1.73	1.46	0.27	0.39

2.3 雄黄连木遗传分化

由表 4 可知,不同种群雄黄连木总基因的遗传多样性  $H_t$  为 0.316 9,种群内基因多样性  $H_s$  为 0.266 0,而种群间遗传分化系数  $G_{st}$  则为 0.160 6,表明 16.06% 的变异存在于种群间,83.94% 的遗传变异存在于种群内,雄黄连木群体间存在

较低的遗传分化,总的遗传分化主要来自其种群内部。雄黄连木种群间的基因流  $N_m$  为 2.612 6( >1),说明该种群间基因交流较为充分。通过 AMOVA 方差分析,结果显示雄黄连木种群内的遗传变异占 93.35%,种群间的变异占 6.65%,说明种群内基因交流明显大于种群间基因交流。

表 4 雄黄连木不同种群遗传分化

POPGEN				AMOVA	
Nei's 总基因多样性	种群内基因多样性	种群间遗传分化系数	种群基因流	种群间	种群内
0.316 9	0.266 0	0.160 6	2.612 6	0.066 5( $P<0.001$ )	0.933 5( $P<0.001$ )

2.4 雄黄连木遗传距离与相似度分析

由表 5 可得,6 个雄黄连木群体间的遗传相似性区间在 0.861 1~0.965 3 之间,遗传距离区间在 0.035 3~0.149 5 之间。其中,南沟村(西沟北坡)和南沟的群体遗传距离最小(0.035 3),安阳监狱群体和南沟村(西沟北坡)群体的遗传

距离最大(0.149 5);安阳监狱和南沟村(西沟北坡)群体间的遗传相似度为最小(0.861 1),南沟村(西沟北坡)和南沟群体间的遗传相似度最大(0.965 3),说明雄黄连木群体间的遗传分化较低,不同群体间相似程度较高。

表 5 不同雄黄连木种群的遗传相似度与遗传距离

种群	南沟村(西沟北坡)	南沟	南沟(东后凹)	南沟村(陈家沟)	安阳监狱	长葛
南沟村(西沟北坡)	—	0.965 3	0.885 2	0.868 4	0.861 1	0.901 9
南沟	0.035 3	—	0.924 5	0.902 8	0.900 2	0.927 4
南沟(东后凹)	0.122 0	0.078 5	—	0.938 3	0.916 4	0.921 9
南沟村(陈家沟)	0.141 2	0.102 2	0.063 7	—	0.946 6	0.940 6
安阳监狱	0.149 5	0.105 1	0.087 4	0.054 8	—	0.956 3
长葛	0.103 2	0.075 4	0.081 3	0.061 3	0.044 7	—

注:对角线上方为遗传相似性,对角线下方为遗传距离。

3 结论与讨论

种质资源是在自然进化过程中形成的,是自然资源的重要组成部分,蕴藏着各种性状遗传基因<sup>[19]</sup>。而植物遗传多样性主要受其分布格局以及遗传变异性高低所主导,包含了同一居群内不同个体的遗传变异、种内基因的分化以及种内不同居群间的遗传变异等<sup>[20]</sup>。对雄黄连木种质资源的遗传多样性进行研究,有利于探寻其遗传多样性丰富水平,掌握其特征及分布规律,对推动优质黄连木种质资源的挖掘利用、育种亲本的合理选配、优良基因的定位等方面具有极其重要的意义<sup>[21]</sup>。

本试验中利用 10 对 AFLP 引物对河南省 6 个不同的雄黄连木种群进行遗传多样性分析,结果显示,在群体水平上,长葛种群的有效等位基因数最高(1.53),安阳监狱以及南沟村(西沟北坡)的有效等位基因数最低(1.43),6 个种群平均值为 1.46,数据显示有效等位基因可能与地理位置存在一定的相关性。6 个种群信息指数平均值为 0.39,Nei's 基因多样性指数平均值为 0.27,说明雄黄连木种质资源具有中等水平的遗传多样性,表明雄黄连木种质资源的遗传多样性可能与其所处的环境和位置有一定关联。这一结果与张金池等对不同地理漆树种源的遗传多样性 AFLP 研究相类似,该分析认为不同漆树种群与海拔标高的相关性低,但是与区域联系紧

密<sup>[22]</sup>。利用这一特性,可以通过更为有效的途径来找出雄黄连木的基因交流和基因多样性方面的一系列问题,为雄黄连木遗传多样性研究提供了一定借鉴意义。此外,本研究雄黄连木种群的遗传多样性水平与前人对黄连木种群遗传多样性研究结果<sup>[23-24]</sup>相似,说明雄黄连木种群和雌雄混合的黄连木种群一样具有较强的适应能力<sup>[25]</sup>。种群间遗传分化系数  $G_{st}$  为 0.160 6,表明 16.06% 的变异存在于种群间,83.94% 的遗传变异存在于种群内,这说明雄黄连木群体间存在较低的遗传分化,而总遗传分化主要来自于其群体内部。雄黄连木种群间基因流  $N_m$  为 2.612 6 ( $>1$ ),说明该种群间基因交流较充分。表明雄黄连木的种群间的基因交流相对不足,但在种群内的基因交流和遗传变异比例相对较高,大多基因变异存在于种群内。遗传分化主要是由居群本身的遗传特性所控制<sup>[26]</sup>,如不同的花粉、种子传播方式,生物以及非生物因子,尤其是人为干扰所引起的遗传变异、地理隔离等;物种的遗传多样性和其分布范围间也存在明显的相关性,与狭域种相比,广布种并不容易受到遗传漂变的作用,故其遗传分化通常较低<sup>[27-28]</sup>。

本研究中,黄连木为雌雄异株乔木,风媒传粉,其花粉和种子的传播受到重力、风力等因素的交互影响,隔离距离越小,群体间的基因流越大,从而导致雄黄连木群体间的遗传分化程度降低<sup>[15,29]</sup>。AMOVA 结果表明,种群内的遗传变异占 93.35%,种群间的变异占 6.65%。进一步证明黄连木的种群间基因交流较少,主要以种群内的基因交流为主,并最终影响遗传结构的形成。6 个雄黄连木种群间的遗传相似性的范围在 0.861 1 ~ 0.965 3 之间,遗传距离范围在 0.035 3 ~ 0.149 5 之间。这一结果阐明黄连木不同种群间相似程度较高,种群间的遗传分化较低。

本研究通过对雄黄连木的遗传多样性进行综合分析,有利于发现其遗传分化特性,为后期研究基因与含油量关系奠定基础。随着生物技术水平和研究手段的进步发展,AFLP 标记技术在雄黄连木的品种遗传多样性和亲缘关系分析、优良种质基因的挖掘、新品种的选育和保护以及种质创新等方面有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] 段 劼,陈 婧,马履一,等. 木本油料树种中国黄连木研究进展[J]. 中国农业大学学报,2012,17(6):171-177.
- [2] 侯新村,牟洪香,杨士春,等. 木本能源植物黄连木研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(12):3524-3525,3534.
- [3] Dong S, Liu Y, Xiong B, et al. Transcriptomic analysis of a potential bioenergy tree, *Pistacia chinensis* Bunge, and identification of candidate genes involved in the biosynthesis of oil[J]. BioEnergy Research, 2016, 9(3): 740-749.
- [4] Yin T M, Difazio S P, Gunter L E, et al. Genome structure and emerging evidence of an incipient sex chromosome in *Populus*[J]. Genome Research, 2008, 18(3): 422-430.
- [5] 何敬房,苏淑棋,冷平生,等. 黄连木组培快繁育苗研究[J]. 北京农学院学报,2011,26(3):44-47.
- [6] 刘琼霞,文礼章,周华建,等. 种子小蜂和空壳果实对生物能源树种黄连木果实和油产量的影响[J]. 昆虫学报,2011,54(10): 1133-1139.

- [7] 李旭新,刘炳响,郭智涛,等. NaCl 胁迫下黄连木叶片光合特性及快速叶绿素荧光诱导动力学曲线的变化[J]. 应用生态学报, 2013, 24(9): 2479-2484.
- [8] 吴志庄,厉月桥,汪泽军,等. 太行山黄连木天然群落物种多样性的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2013,33(12):15-18.
- [9] 李婉婷,王振章,管 菊,等. 河南长葛-安阳黄连木遗传多样性分析[J]. 分子植物育种,2017,15(10):4256-4262.
- [10] 江 梅,李小平,温 强,等. AFLP 标记及其在植物中的应用[J]. 江西林业科技,2006(5):41-44.
- [11] Becker J, Vos P, Kuiper M, et al. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley[J]. Molecular and General Genetic, 1995, 249(1): 65-73.
- [12] 翁跃进. 花生 AFLP 指纹图谱[J]. 中国油料作物学报,1999,21(1):11-13.
- [13] 彭欲率,韩延闯,汪 岚,等. 应用 AFLP 技术检测莲藕遗传多样性的初步研究[J]. 分子植物育种,2004,2(6):823-827.
- [14] Mian M A, Zwonitzer J C, Chen Y, et al. AFLP diversity within and among hardinggrass populations[J]. Crop Science, 2005, 45(6): 2591-2597.
- [15] 程小毛,李 响,姜永雷,等. 基于 AFLP 的滇西北玉龙雪山不同海拔川滇高山栎遗传多样性分析[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(1): 22-27.
- [16] 魏湖南,赵喜萍,田敏爵,等. 应用植物形态学和 AFLP 分子标记鉴别陕西漆树品种[J]. 西北植物学报,2010,30(4):665-671.
- [17] 胡标林,万 勇,李 霞,等. 水稻核心种质表型性状遗传多样性分析及综合评价[J]. 作物学报,2012,38(5):829-839.
- [18] 侯雅君,张宗文,吴 斌,等. 苦养种质资源 AFLP 标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2009,42(12):4166-4174.
- [19] Dow B, Ashley M, Howe H. Characterization of highly variable (GA/CT)<sub>n</sub> microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(1):137-141.
- [20] 程小毛,王振章,姜永雷,等. 滇西北玉龙雪山不同海拔川滇高山栎遗传多样性分析[J]. 分子植物育种,2016,14(5):1329-1335.
- [21] Vos P, Hogers R, Bleeker M A. A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucle Acids Research, 1995, 23(21):4407-4414.
- [22] 张金池,贺 娜,靳 蓉,等. 不同地理漆树种源的遗传多样性 AFLP 分析[J]. 中国生漆,2016,35(2):45-52.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 葛 颂,洪德元. 生物多样性研究的原理和方法[M]. 北京:中国科学技术出版社,1994.
- [26] Bennett K D, Haberle S G, Lumley S H. The last glacial - Holocene transition in Southern Chile[J]. Science, 2000, 290(5490):325-32.
- [27] Hamrick J L, Godt M, Sherman - broyles S L. Factors influencing levels of genetic in woody plant species[J]. New Forests, 1992(6): 95-124.
- [28] Hoch P C, Stephenson A G. Experimental and molecular approaches to plant biosystematics[J]. BioScience, 1996, 46(9):715-717.
- [29] 汪小凡,廖万金,宋志平. 小毛茛居群的遗传分化及其与空间隔离的相关性[J]. 生物多样性,2001(2):138-144.