

# 栓皮栎群体 cpDNA 变异初步研究

王世春<sup>1</sup>, 徐立安<sup>1</sup>, 陈 劼<sup>1</sup>, 王利平<sup>2</sup>

(1 南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 江苏 南京 210037)

(2 余姚市林业特产技术推广总站, 浙江 余姚 315400)

[摘要] 对收集栓皮栎主要分布区的 19 个天然群体, 利用 PCR-RFLP 技术对群体的变异进行研究. 对 4 个 cpDNA 片段 PCR-RFLP 研究表明: 19 个群体间有较好的多态性, 共发现 9 种单倍型. 单倍型变异主要出现在群体间, 群体内变异很小, 群体间遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 为 0.8488 而群体内遗传多样性只占 15.12%. 栓皮栎的现有分布格局可能是第四纪冰川后, 以秦岭以南的川东到大别山区一带为中心, 不同的适应类型向四周逐步扩散的结果.

[关键词] 栓皮栎, cpDNA, PCR-RFLP, 单倍型

[中图分类号] Q 341 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)03-0109-05

## Preliminary Study of cpDNA Variation of *Quercus Variabilis* Populations

Wang Shichun<sup>1</sup>, Xu Lian<sup>1</sup>, Chen Jie<sup>1</sup>, Wang Leping<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology, Nanjing Forestry University, Ministry of Education, 210037, China)

(2. Forestry Speciality Technique Popularity Total Station of Yuyao City, 315400, China)

**Abstract** Population variation of nineteen *Quercus variabilis* natural populations in nine provinces of China was studied with PCR-RFLP markers. A relatively fine polymorphism was detected in *Q. variabilis* by restriction analysis of PCR-amplified cpDNA fragments. Nine haplotypes were observed among the 19 populations. The majority of genetic variations occurred between populations, which could be concluded from the high  $G_{st}$  (0.8488). However the genetic diversity within the populations was only 15.12%. The existent distribution of *Q. variabilis* was probably the result of diffusion mainly from eastern of Sichuan, southern of Qinling Mountain to Dabie Mountain after the Quaternary glacier to all directions with different adaptive types.

**Key words** *Q. variabilis*, cpDNA, PCR-RFLP, haplotype

栓皮栎 (*Q. variabilis*) 是我国暖温带落叶阔叶林和亚热带常绿落叶阔叶混交林的重要组成树种和多用途树种<sup>[1]</sup>. 与核基因组 DNA 相比, 尽管 cpDNA 进化慢, 但基因组小, 对于遗传漂变、瓶颈效应等较核 DNA 敏感, 在被子植物中一般表现为母本遗传, 使植物群体内变异小而群体间分化大, 是系统地理学研究的较理想的标记<sup>[2]</sup>, PCR-RFLP 标记技术是建立在 PCR 技术基础上的新型 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 分子标记技术, 已被用于对很多种及种上分类单位 cpDNA 变异的研究<sup>[2]</sup>; 但是用该标记来研究栓皮栎地理种群变异还未见报道. 利用 PCR-RFLP 分子技术研究栓皮栎群体的地理变异特点, 为栓皮栎资源的保护和合理利用提供一些理论依据, 并为进一步研究栓皮栎的起源和遗传多样性奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本次实验共采集全国 9 个省 19 个群体, 所有样本均采自天然林. 其中 8 个群体采自栓皮栎分布集中的大别山和秦岭, 树龄一般在 30 年以上, 混生树种有侧柏、油松、榿栎等, 郁闭度 0.7 以上 (见表 1). 采集

收稿日期: 2008-12-16

基金项目: 国家自然科学基金 (30571515).

通讯联系人: 徐立安, 教授, 研究方向: 林木遗传. E-mail: lxu@njfu.edu.cn

成熟种子置于棉布袋中保存, 每个群体采集 5 棵以上母树, 每棵母树收集 30 粒以上的种子. 2007 年 2 月播种.

1.2 总 DNA 提取

每个群体随机采摘 5 个样本, 采用改进的 CTAB 裂解——硅珠吸附法从新鲜叶片中提取栓皮栎总 DNA<sup>[3]</sup>.

1.3 PCR 引物选择

本次研究通过叶绿体 DNA ( cpDNA ) 中的 4 个基因间区 ( 间区 DT: tmD–tmT, 间区 AS psaA–tmS, 间区 CD psbC–tmD, 间区 TF: tmF–tmF ) 限制性片段 ( PCR-RFLP ) 的分析, 来研究群体间的变异. 这 4 个间区的限制性片段长度在栎属中存在较丰富的多态性, Dumolin-Lapegue<sup>[4]</sup> 等曾经用这些区域研究了欧洲 8 种白栎 345 个群体的系统地理变异. 本实验采用的引物, 退火温度, 限制性内切酶种类, 酶切温度见表 2

表 1 种源采集地理分布基本情况  
Tab 1 The geographic distribution of provenance

序号	种源	母树数	地理位置	
			纬度	经度
1	陕西宁强	32	N 32° 57′	E 106° 14′
2	陕西安康	35	N 32° 40′	E 109° 04′
3	陕西长安	13	N 34° 00′	E 108° 58′
4	陕西钟吕坪	9	N 34° 07′	E 107° 51′
5	陕西黄龙	20	N 35° 34′	E 110° 06′
6	安徽六安	24	N 31° 44′	E 116° 5′
7	安徽滁州	26	N 32° 17′	E 118° 17′
8	安徽祁门	20	N 29° 52′	E 117° 7′
9	湖北麻城	28	N 31° 17′	E 115°
10	湖北房县	30	N 32°	E 110° 7′
11	湖北兴山	35	N 31° 2′	E 110° 7′
12	河南驻马店	20	N 32° 8′	E 114° 01′
13	河南济源	11	N 35° 08′	E 112° 57′
14	河南内乡	26	N 33° 05′	E 111° 50′
15	江西武宁	15	N 29° 26′	E 115° 1′
16	广西乐业县	18	N 24° 47′	E 106° 57′
17	福建来舟	30	N 26° 8′	E 117° 8′
18	云南东川	15	N 25° 05′	E 102° 7′
19	江苏南京	22	N 32° 03′	E 113° 52′

表 2 PCR-RFLP 引物序列

Table 2 List of the pairs of primers used in this study

引物	缩写	退火温度	内切酶	酶切温度 /℃
tmC5′ CCA GTTCAAA TC GG GTGTC3′ tmD5′ GG GATTG TAGT TCAA TGCT3′	CD	58℃	TaqI	65
tmD5′ ATTGA ACTACAATCCCA AGC3′ tmT5′ CTGAATAA GTCATTGCGCCAC 3′	DT	55℃	A luI	37
psaA 5′ ACTTCTGGTTC CGGCGAAGA A3′ tmS5′ AACCA CTG GCGATCTCTCTCT A3′	AS	58℃	H infI	37
tmT5′ CATTACAAA TGCGATGCTCT3′ tmF5′ ATTTGAA CTG GTGACACGAG 3′	TF	57. 5℃	H infI	37

1.4 PCR-RFLP 分析

PCR 扩增的 10 μL 反应体系为: DNA 模板量约 10~ 20 ng, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, pH 8. 3, MgCl<sub>2</sub> 1. 8~ 2. 0 mmol/L, dNTP 100 μmol/L, 引物 0. 2 μmol/L, Taq 酶 1 U. PCR 扩增程序为 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 45 s, 55~ 58℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 2~ 4 min, 共 30 循环; 72℃ 10 min 延伸补齐. PCR 产物用 TaqI, HinfI, AclI 酶切. 酶切反应总体积 25 μL, H<sub>2</sub>O 8. 5 μL; BUFFER 1 μL; 限制性内切酶 0. 5 μL; PCR-Product 15 μL; 37℃ ~ 65℃; 保温 3~ 16 h. 酶切后用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳、银染、拍照<sup>[5]</sup>. (图 1, 2)

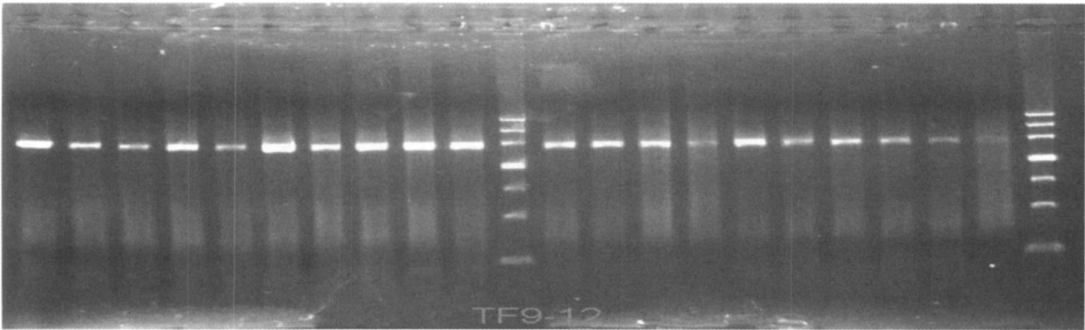


图 1 部分栓皮栎群体 PCR 扩增结果

Fig.1 Production of part of *Quercus variabilis*

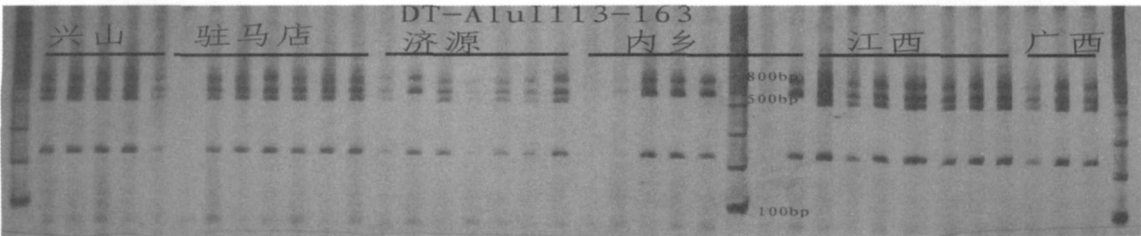


图 2 部分栓皮栎群体酶切结果  
Fig.2 Production of part of *Quercus variabilis*

1. 5 数据分析

通过人工读图, 判断单倍型组合. 按照每对引物独立读图, 根据酶切片段数目与大小判读. 相同的酶切片段, 且片段大小相同记为一种类型, 有几种类型就用几种不同数字代表. 将各对引物的读图数据统计在一张表格内, 从第一个样品开始统计各个位点的数字组合, 出现的第一种组合记为“ $h_1$ ”, 第二种数字组合记为“ $h_2$ ”, 以此类推, 有几种单倍型就有几种数字组合, 相同的单倍型具有相同的数字组合.

采用 POPGEN3.2 软件计算基因流 ( $Nm$ ), 群体间分化系数 ( $G_{st}$ ) 和遗传距离.

2 结果与分析

2. 1 cpDNA 单倍型分析

单倍型种类以及在各个群体, 各个省份分布情况可以很好的揭示地理群体间的系统发育关系. 各个群体的单倍型种类统计见表 3 由表可知: 这 9 个单倍型不是平均分布在各个地区的, 而是大多数的单倍型集中分布在一个地区或一定的范围内. 其中单倍型  $h_1$ ,  $h_6$  单倍型分布较广, 在 6 个群体中均有出现.  $h_4$ ,  $h_9$  在 3 个群体均有分布.

从单倍型分布图 (图 3) 可以看出, 分布中心秦岭和大别山的单倍型种类丰富. 边缘地区的单倍型在分布中心几乎都能找到. 陕西宁强、长安、黄龙; 安徽滁州、祁门和广西共享一种单倍型  $h_5$ ; 陕西钟侣平、湖北麻城、福建来舟、云南东川和江苏南京群体共享一种单倍型  $h_6$ ; 湖北兴山、河南驻马店和济源共享一种单倍型  $h_9$ ; 陕西安康、湖北房县和江西武宁共享单倍型  $h_4$ ; 陕西钟侣平和河南内乡共享单倍型  $h_5$ ; 安徽六安群体独享单倍型  $h_7$ ,  $h_8$ .

2. 2 群体遗传结构分析

据表 4 分析结果表明, 栓皮栎种群内总的基因多样性  $H_t$  为 0. 292 5 种群内基因多样性  $H_s$  为 0. 044 2 种群间基因多样性  $D_{st}=H_t-H_s$  为 0. 248 3 种群的遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 为 0. 848 8 基因流  $Nm$  为 0. 089 种群间的遗传分化系数较高, 说明了栓皮栎群体间遗传变异要大于群体内部, 这比刘宇<sup>[6]</sup>  $G_{st}=0. 942 9$  小, 与徐小林<sup>[7]</sup>  $G_{st}=0. 045 5$  所得出的结论正好相反, 这

表 3 各个群体单倍型数据统计

Table 3 Statistics of haplotype of each population									
种源	$h_1^*$	$h_2$	$h_3$	$h_4$	$h_5$	$h_6$	$h_7$	$h_8$	$h_9$
1(宁强)	2	3							
2(安康)			3	2					
3(长安)	5								
4(钟侣平)					3	2			
5(黄龙)	5								
6(六安)							3	2	
7(滁州)	5								
8(祁门)	5								
9(麻城)						5			
10(房县)				3		2			
11(兴山县)									5
12(驻马店)									5
13(济源)									5
14(内乡)					5				
15(江西)				5					
16(广西)	5								
17(来舟)						5			
18(云南)						5			
19(南京)						5			
总和	27	3	3	10	8	24	3	2	15

表 4 栓皮栎的群体分化

Table 4 Population differentiation of <i>Quercus variabilis</i>					
位点	样本大小	$H_t$	$H_s$	$G_{st}$	$Nm^*$
CD	95	0. 307 1	0. 025 3	0. 917 7	0. 044 8
DT	95	0. 154 2	0. 025 3	0. 836 2	0. 097 9
AS	95	0. 607 4	0. 075 8	0. 875 2	0. 071 3
TF	95	0. 101 1	0. 050 5	0. 5	0. 5
M ean	95	0. 292 5	0. 044 2	0. 848 8	0. 089
S t Dev		0. 051 7	0. 000 6		

是因为叶绿体 DNA 进化速度慢, 为母本遗传, 与核基因组进化速度快, 双亲遗传的方式不同所至.

2.3 群体间的相关

利用非加权配对算术平均法 (UPGMA), MEG3.1 软件作系统聚类如图 4 通过聚类图可以看出, 同一省的群体亲缘关系较近, 聚类较为集中. 陕西宁强、安康、长安和钟侣平聚成一类, 而陕西黄龙和安徽的 3 个群体六安、滁州、祁门聚为一类. 云南东川、江苏南京、福建来舟与湖北的麻城和房县聚为一类, 而湖北兴山县群体与河南的驻马店、济源和內乡聚为一类.

3 讨论

3.1 cpDNA 遗传多样性

对所有 19 个群体来说, 4 种引物组合共揭示出 9 种单倍型, 多数群体只具有一种单倍型, 说明群体内 cpDNA 多样性很低, 单倍型的变异主要存在群体间, 单倍型之间已出现了明显的地理分化. 通过 cpDNA 研究获得结果在群体间分化很大, 与核 DNA 的研究结果有明显差异 (徐小林, 2004), 其原因主要是核 DNA 是双亲遗传, 群体内由于 DNA 重组导致变异丰富, 而群体间只要选择压力不出现大的差异和明显的随机漂变, 分化就小. 由于栓皮栎 (栎属) cpDNA 为母本遗传, DNA 不发生重组使群体内变异很小, 而在群体间只要有小的变异就会显示出来, 经过多世代的演变, 最终表现为群体间分化大.

3.2 栓皮栎分布格局的形成

Dumolin-Lapegue 等 (1997) 曾经用 cpDNA 研究了欧洲 8 种白栎 345 个群体, 发现了 23 种单倍型; 根据单倍型分布推测栎树冰期避难所位于欧洲南部, 尤其是伊比利亚半岛和意大利<sup>[4]</sup>. 我国存在许多东西走向的大山, 减缓了冰期时低温对生物的影响, 为许多生物提供了避难场所. 中国由于地处中低纬地区, 第四纪冰川影响范围有限, 除了青藏高原等西部高山高原冰川曾有大幅度扩张外, 东部地区真正的古冰川遗迹十分零星. 第四纪冰期中中国北方处于冰缘环境之下, 冻土南界可达 40°N. 目前华北的夏绿阔叶林冰期中被干草原取代, 中国的纬度地带平均向南推移 8°~10°. 垂直地带在冰期中也明显下降, 雪线和暗针叶林下限均下降约 1 000m<sup>[8]</sup>. 在第四纪冰川时期, 古生代末期隆起的秦岭、大巴山阻挡第四纪冰川的袭击, 由于川东、鄂西、大别山一带地貌类型复杂、生态环境多样, 使其成为第四纪冰期以后植物异质分化的策源地, 不断孕育新种<sup>[9]</sup>. 李珊<sup>[10]</sup>应用 RAPD 标记技术对金钱槭属植物进行了系统地理学研究, 认为当第四纪冰川来临时, 金钱槭避难于秦岭南坡、大巴山东段、山民山山脉及武陵山东部的局部地区. 当冰期结束气候缓和时, 避难于秦岭南坡的金钱槭个体分别向东北、西北方向回迁, 避难于大巴山东段的金钱槭则向西北方向迁移, 形成现今的分布格局.

川西、陕西南部、鄂西、大别山一带是栓皮栎现有中心分布区, 根据本研究结果 (表 4), 处于这一区域的陕西 (5 个群体有 6 个单倍型)、湖北 (3 个群体 3 个单倍型)、安徽 (3 个群体 3 个单倍型) 等省境内栓皮栎具有较丰富的单倍型, 河南境内 3 个群体有 2 个单倍型, 而更大范围内的其他各省区 (江苏、江西、福建、云南、广西) 共 5 个群体, 但只有 3 个单倍型, 而且所有 3 个单倍型在中心分布区都能找到, 来自江苏、福

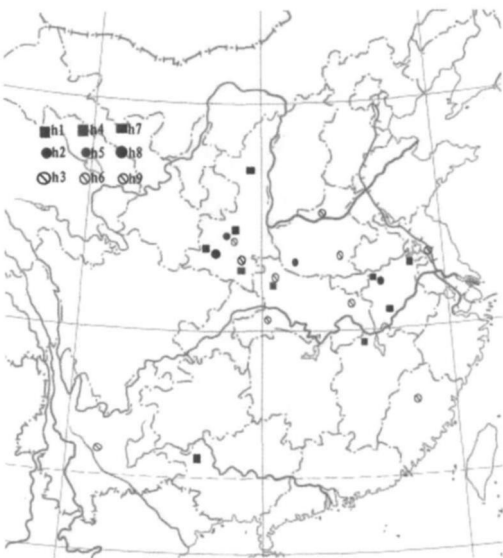


图 3 各单倍型分布图  
Fig.3 The distribution of each haplotype

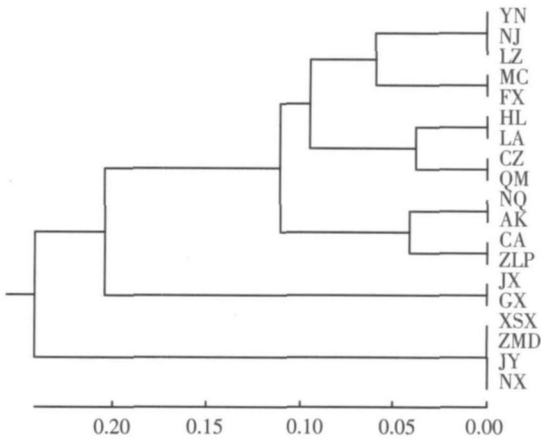


图 4 栓皮栎群体系统聚类图 (UPGMA)

Fig.4 Dendrogram of Q.variabilis populations

NQ-宁强, AK-安康, CA-长安, ZLP-钟侣平, HL-黄龙, LA-六安, CZ-滁州, QM-祁门, MC-麻城, FX-房县, XSX-兴山县, ZMD-驻马店, JY-济源, NX-內乡, JX-江西, GX-广西, LZ-来舟, YN-云南, NJ-南京

建、云南的群体享有同一个单倍型。这些结果表明, 栓皮栎现有分布中心也是遗传多样性的中心。刘宇<sup>[6]</sup>的研究结果表明, 安徽 12 个群体有 10 种 cpSSR 单倍型, 陕西省 6 个群体有 4 种单倍型, 而广西、山东共 6 个群体只发现了 2 种单倍型, 非中心分布区的单倍型远不如中心区丰富, 与本研究的结果一致。因此, 秦岭以南的陕西南部、湖北、安徽一带可能是第四纪冰川后栓皮栎多样性的起源地, 冰川后在长期进化演变中, 适应寒冷的变异类型, 逐步占领高纬度地区, 而适应温湿的类型, 逐步向南部蔓延, 从而造成了栓皮栎的现有分布格局。

### 3.3 栓皮栎遗传资源保护策略

研究结果表明, 栓皮栎现有的分布中心与遗传多样性中心较为一致(图 3)。栓皮栎在我国分布广泛, 在我国除内蒙古、青海、新疆、宁夏、黑龙江、西藏外, 其他各省区都有分布。但是长期以来只砍不造随其自然发展, 分布区内资源严重萎缩, 可利用资源枯竭, 一些优良种质资源丧失<sup>[11]</sup>, 遗传资源的保护迫在眉睫。根据栓皮栎的遗传多样性中心与现有分布中心一致的特点, 应重点放在对分布中心进行保护上, 可以采取建立自然保护区和国家森林公园作为主要形式; 而对农民生产上的需要, 主要通过人工造林。同时, 对于非中心区域的栓皮栎, 也要注意保护耐寒、耐高温、耐干旱等不同类型的自然群体。

### [参考文献]

- [1] 傅焕光, 于光明. 栓皮栎栽培与利用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1978 7-10
- [2] Petit R J. Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations [J]. *For Ecol Manage*, 2002, 156: 5-26
- [3] Zhu Q hui, Pan H u i n, Zhu G e q i a n g et al. Analysis of genetic structure of natural population of *Castanopsis fargesii* by RAPDs [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(11): 1321-1326
- [4] Dumolin-Lapegue S. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent [J]. *Genetics*, 1997, 146: 1475-1487
- [5] Demeure B, Sodzi N, Petit R J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants [J]. *Mol Ecol*, 1995, 4: 129-131.
- [6] 刘宇. 栓皮栎群体 cpSSR 遗传分析 [D]. 南京: 南京林业大学森林资源与环境学院, 2007.
- [7] 徐小林, 徐立安, 黄敏仁, 等. 栓皮栎天然林群体 SSR 遗传多样性研究 [J]. *遗传*, 2004, 26(5): 683-688
- [8] 李吉均, 舒强, 周尚哲, 等. 中国第四纪冰川研究的回顾与展望 [J]. *冰川冻土*, 2004, 26(3): 236-243
- [9] 贺昌锐, 陈芳清. 长江三峡库区分布的中国种子植物特有属 [J]. *广西植物*, 19(1): 43-46
- [10] 李珊. 金钱槭属植物保护遗传学与分子亲缘地理学研究 [D]. 西安: 西北大学生命科学学院, 2004
- [11] 张健民, 陈恩军, 罗军民, 等. 栓皮栎遗传改良迫在眉睫 [J]. *中国林业*, 2003, (2A): 23

[责任编辑: 孙德泉]