



## 研究报告

### Research Report

# 基于 cpDNA *atpB-rbcL* 非编码序列分析桫欏种群遗传结构和遗传多样性, 以贵州赤水桫欏国家级自然保护区为例

杨明照<sup>1,2</sup> 应站明<sup>3</sup> 喻君生<sup>4</sup>

1 广州卫生学校, 广州, 510450

2 广州医学院卫生职业技术学院, 广州, 510450

3 萍乡高等专科学校, 萍乡, 337000

4 中山大学, 广州, 510275

✉ 通讯作者: [mzyang712@163.com](mailto:mzyang712@163.com); ✉ 作者

植物药与药理学杂志, 2013 年, 第 2 卷, 第 5 篇 doi: [10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0005](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0005)

收稿日期: 2013 年 04 月 05 日

接受日期: 2013 年 04 月 21 日

发表日期: 2013 年 04 月 28 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2013, Vol.32, No.2)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

杨明照等, 2013, 基于 cpDNA *atpB-rbcL* 非编码序列分析桫欏种群遗传结构和遗传多样性, 以贵州赤水桫欏国家级自然保护区为例, 植物药与药理学杂志(online) Vol.2 No.5 pp.1-4 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0005](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0005))

引用格式(英文):

Yang et al., 2013, Genetic structure and differentiation in the populations of *Alsophila spinulosa* revealed with cpDNA *atpB-rbcL* noncoding sequences, an example of Asphole National Nature Reserve in Chishui of Guizhou, *Zhiwuyao Yu Yaolixue Zazhi* (online) Vol.2 No.5 pp.1-4 (doi: [10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0005](https://doi.org/10.5376/jpmpp.cn.2013.02.0005))

**摘要** 以 PCR 产物克隆后测序的方法测定了贵州赤水桫欏国家级自然保护区三个种群 59 个个体的叶绿体 DNA(CpDNA) *atpB-rbcL* 非编码区序列。序列长度介于 727~732 bp 之间, 具长度多态性, A+T 百分比含量较高, 介于 63.27%~63.89% 之间。遗传多样性水平较低, 表现出较高的单倍型多样性( $h=0.639$ )和低的核苷酸多样性( $D_{ij}=0.00028$ )并存的特征, 提示现有种群可能源自一个有效群体规模较小的种群的快速扩张, 扩张时间尚短, 不足以形成更为复杂的遗传结构。种群间的高基因流  $Nm$ , 低遗传分化度  $F_{ST}$ , AMOVA 分析以及 DNA 歧异度结果一致显示各种群间无明显的遗传分化。

**关键词** 桫欏, 叶绿体 DNA *atpB-rbcL* 非编码序列, 遗传结构, 遗传多样性

## Genetic structure and differentiation in the populations of *Alsophila spinulosa* revealed with cpDNA *atpB-rbcL* noncoding sequences, an example of Asphole National Nature Reserve in Chishui of Guizhou

Yang Mingzhao<sup>1,2</sup> Ying Zhanming<sup>3</sup> Yu Junsheng<sup>4</sup>

1 Guangzhou Health School, Guangzhou, 510450

2 College of Health Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou, 510450

3 Pingxiang College, Pingxiang, 337000

4 Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510275

✉ Corresponding author, [mzyang712@163.com](mailto:mzyang712@163.com); ✉ Authors

**Abstract** I Chloroplast DNA (cpDNA) *atpB-rbcL* noncoding sequence of *Alsophila spinulosa*, collected from three populations distributed at Asphole National Nature Reserve in Chishui of Guizhou province were sequenced. Sequence length varied from 726 bp to 732 bp, showing length polymorphism, with high A+T content between 63.27% and 63.89%. High level of haplotype diversity ( $h=0.639$ ) and a low nucleotide diversity ( $D_{ij}=0.00028$ ) were detected in the populations of *Alsophila spinulosa*. This suggested rapid demographic expansion from a small effective population, and, since then, there has been insufficient time to form a more complicated population structure. Observed high gene flow  $Nm$ , low  $F_{ST}$ , AMOVA analysis and DNA divergence data consistently indicated that no genetic differentiation should occur at the population level.

**Keywords** *Alsophila spinulosa*, cpDNA *atpB-rbcL* noncoding sequence, Genetic structure, Genetic diversity.

菊桫欏(*Alsophila spinulosa*(Wall.ex Hook.)Tryon)属桫欏科(Cyatheaceae)桫欏属(*Alsophila*), 是古老的冰川孑遗植物, 有“活化石”之称, 国家濒危保护植物。在距今 1.8 亿年前的中生代侏罗纪时期桫欏已经存在, 且分布范围很广, 十分繁盛, 经第四纪冰川的侵袭后, 其生存受到严重的影响, 现今其分布区已大大缩小(Tryon, 1970), 仅分布在热带、亚热带地区(Lucansky, 1974; Willis, 2002), 在我国, 桫欏自然种群主要分布在广东、广西、台湾、福建、海南、贵州、四川、云南等地区(夏群, 1989, 中国桫欏科植物的分类, 植物分类学报, 27(1): 1-16)。



桫欏是研究物种形成与植物地理分布关系, 地质学及古生物学的理想材料, 尽管近些年在生态、形态、人工繁殖、物候等方面对其有不同程度的研究, 遗传学方面的研究也取得了一定进展, 但其分子群体研究仍嫌不足。

目前用于系统学研究的叶绿体基因间隔区主要有 *atpB-rbcL*、*trnC-rpoB*、*trnL-trnF* 等非编区, 其单亲遗传及快速近中性的进化方式使之适用于种内地理亲缘模式的重建(Ferris et al., 1990), 同时 DNA 测序在技术上回避了 RFLP 及以 PCR 为基础的 DNA 指纹技术无法区分具相同长度但序列不同的片段的局限性。*atpB-rbcL* 间隔区的通用引物被设计出后, 这一非编码区被广泛用于种群水平系统发育的分析(Schaal et al., 1998; Huang et al., 2001; Chiang et al., 2001; Trewick et al., 2002; Lu et al., 2002; Hwang et al., 2003)。贵州赤水桫欏国家级自然保护区属中亚热带湿润季风气候, 河谷具有类似南亚热带气候特征, 冬无严寒, 夏无酷暑, 湿度大, 达 90%, 年降水量 1200~1300mm, 云雾雨日多, 是全国日照最少地区之一, 河谷全年不足 650 小时, 山顶也未超过 1000 小时, 是桫欏生长的理想之地。

本研究以保护区内三个种群为材料, 通过分析 cpDNA *atpB-rbcL* 非编码序列, 检测其遗传多样性及分化水平, 探讨与桫欏种群遗传结构形成有关的因素, 为桫欏的研究和保护提供分子遗传学方面的依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 DNA 提取和 PCR 产物

提取的桫欏总 DNA 片段大小约为 20 kb 位置(图 1), 除个别条带有一定程度的降解外, 其它条带带型较好。紫外分光光度测定的 DNA 的 A260/A280 的值均在 1.785-2.203 之间, 显示总 DNA 的浓度及纯度符合实验要求。PCR 扩增后, 回收产物经过电泳检测显示条带清晰, 无杂带(图 2), 可用于测序。

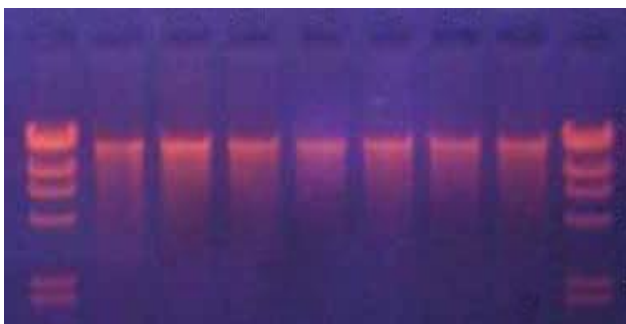


图 1 桫欏总 DNA

Figure 1 Total DNA of *Alsophila spinulosa*

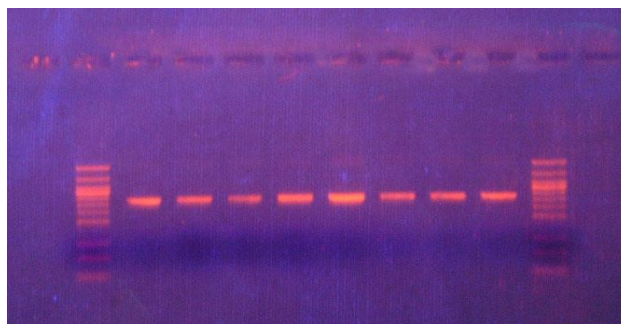


图 2 桫欏 *atpB-rbcL* 回收产物检测

Figure 2 Detection of *Cyathea atpB-rbcL* recovery products

### 1.2 种群遗传结构及遗传多样性

样品的 cpDNA *atpB-rbcL* 非编码区序列长度介于 727~732bp 之间, 具长度多态性, A+T 百分比含量较高, 介于 63.27%~63.89% 之间。59 个体共检测到 9 个单倍型, 单倍型多样性( $h=0.639$ )较高, 核苷酸多样性 ( $D_{ij}=0.00028$ )低, 且各种群差别不大(表 1)。

表 1 cpDNA *atpB-rbcL* 非编码序列单倍型多样性( $h$ )和核苷酸多样性( $D_{ij}$ )

Table 1 Haplotype diversity( $h$ )and Nucleotide diversity( $D_{ij}$ )of cpDNA *atpB-rbcL* noncoding sequence

| 种群<br>(Populations) | 样本数<br>sample size | 单倍型<br>Haplotype | 单倍型多样性( $h$ )<br>Haplotype diversity( $h$ ) | 核苷酸多样性( $D_{ij}$ )<br>Nucleotide diversity( $D_{ij}$ ) |
|---------------------|--------------------|------------------|---|--|
| Total               | 59                 | 9                | 0.639±0.058                                 | 0.00028±0.00012  |
| LCH                 | 19                 | 5                | 0.713±0.077                                 | 0.00014±0.00013  |
| HSG                 | 20                 | 6                | 0.632±0.113                                 | 0.00041±0.00026  |
| ZHG                 | 20                 | 4                | 0.595±0.098                                 | 0.00026±0.00015  |

基于桫欏 cpDNA *atpB-rbcL* 非编码区序列变异计算出种群间基因流  $Nm$  较高, 介于 5.52~6.64 之间, 种群分化度  $F_{ST}$  较低, 介于 0.0000~0.03448 之间(表 2)。AMOVA 分析显示有 85.16% 的遗传变异来种群内 ( $P$



<0.001)。从种群间 DNA 歧异度角度来分析, 核苷酸差异平均数和每位点核苷酸替换平均数均较低, 分别介于 0.154~0.250 之间和 0.00021~0.00034 之间(表 3)。

表 2 cpDNA *atpB-rbcL* 非编码区比较桫欏种群间的  $Nm$ (对角线上)和  $F_{ST}$ (对角线下)

Table 2 Pairwise comparisons of  $Nm$  (above diagonal) and  $F_{ST}$  (below diagonal) between populations of *A.podophylla* based on cpDNA *atpB-rbcL* noncoding sequences

| 种群(Populations) | LCH     | HSG     | ZHG  |
|-----------------|---------|---------|------|
| LCH             |         | 9.49    | 5.52 |
| HSG             | 0.00000 |         | 6.64 |
| ZHG             | 0.03448 | 0.02105 |      |

表 3 种群间核苷酸差异平均数(对角线上)和每位点核苷酸替换平均数(对角线下)

Table 3 Average number of nucleotide differences (above diagonal) and average number of nucleotide substitution per site (below diagonal) between populations of *A.podophylla*.

| 种群(Populations) | LCH     | HSG     | ZHG   |
|-----------------|---------|---------|-------|
| LCH             |         | 0.230   | 0.154 |
| HSG             | 0.00028 |         | 0.250 |
| ZHG             | 0.00021 | 0.00034 |       |

## 2 讨论

使研究表明, 桫欏种群间有较高的基因流  $Nm$ , 考虑到桫欏种群现代生境的片断化, 桫欏科植物孢子有限的迁移能力以及孢子自身脆弱的生命力(程志英等, 1990), 推测统计上的高基因流并不一定表示种群间能够实现高效的基因流, 也可能是选择压力相同造成的。桫欏种群的遗传多样性水平低, 表现出较高的单倍型多样性和低核苷酸多样性并存的特征, 这种式样提示现有种群源自有一个有效群体规模较小的种群的快速扩张(Avise, 2000)。地质研究表明在更新世形成了寒冷的冰期和温暖的间冰期的多次交替(Bennett, 1990), 冰期种群的缩小, 间冰期种群的增长, 能够消除过去积累的核苷酸多样性, 但又能快速导致少数碱基位点的变异, 单个碱基的变异可以生成新的单倍型, 但对核苷酸多样性的影响有限, 从而使单倍型多样性相对高, 但核苷酸多样性的积累还需更长时间, 奠基者效应和瓶颈效应可能是影响桫欏种群遗传结构的一个重要原因。桫欏种群间低的遗传分化度  $F_{ST}$ , AMOVA 分析以及 DNA 歧异度结果一致显示, 基于 cpDNA *atpB-rbcL* 非编码区序列分析, 各种群之间无明显的遗传分化。

根据桫欏种群遗传结构和遗传多样性水平, 建议对保护区内桫欏进行就地保护, 重视分布点内尽可能多个体的保护, 防止人为的砍伐和生境的退化, 采取策略促进这些群体内的幼苗更新, 建立在不同生态序列内的桫欏种群永久观察点, 定期观察与研究桫欏种群的动态发展。在迁地保护、取样以及育种时, 应在较大群体中尽可能多取样, 最大限度地保护桫欏的遗传多样性。

## 3 材料和方法

### 3.1 实验材料

提样品采自贵州赤水桫欏自然保护区内三个种群, 采样树高 0.6~5.0 m 不等, 每个种群选取个体之间距离大于 20 m, 将采集的叶片编号, 置于硅胶中密封保存。采样种群分布(表 4)。

表 4 桫欏样品采集资料

Table1 Sampling details of *Alsophila spinulosa*

| 种群<br>Populations | 经纬度<br>Coordinate | 海拔(m)height(m) | 实验用样<br>Sample size | 生境<br>Habitat |
|-------------------|-------------------|----------------|---------------------|---------------|
| 两岔河(LCH)          | E106°01' N 28°25' | 470~557        | 19                  | 溪边树林、竹林       |
| 葫市沟(HSG)          | E106°01' N 28°29' | 555~602        | 20                  | 溪边竹林、山崖下      |
| 紫黄沟(ZHG)          | E105°59' N 28°25' | 459~546        | 20                  | 溪边竹林、山崖下      |



## 3.2 实验方法

### 3.2.1 总 DNA 提取

DNA 的提取采用改进的 CTAB 法(苏应娟等, 1998; 张岳峰等, 2008), 琼脂糖电泳检测所提取总 DNA 片段的大小及质量, 紫外分光光度计检测 DNA 样品的浓度和纯度, 稀释至 50ng/μl, 用做 PCR 扩增的模板。

### 3.2.2 PCR 扩增与回收

每 50μl 反应体系含 50mmol/L 的 KCl, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L 的 Tris-HCl, 0.1% TritonX-100, dNTP 各 0.1mmol, 模板 50ng, Taq 酶 1.25U, Pfu 酶 0.3U, 引物 atpB: BACATCKARTACKGGACCAATAA, rbcL: AACACCAGCTTTTRAATCCAA

引物序列由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 扩增程序 94℃ 预变性 7 min, 94℃ 45 s, 52℃ 50 s, 72℃ 90 s, 32 个循环, 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 并在上样孔两端加入与 PCR 产物检测等量的 100 bp DNA Ladder 与目的片段对照。产物经浓缩, 电泳分离后回收。

### 3.2.3 克隆测序

回收产物与 pMD18-T 载体连接, 转入感受态 DH5-α 细胞中, 于含有 50ng/mL Amp 的平板培养基上采用蓝白筛选的方法获得克隆, PCR 扩增后电泳检测 T 载体中插入片段的大小, 确定阳性克隆, 应用载体两端通用引物 M13F 和 M13R 在 3730 自动测序仪上测序。

### 3.2.4 数据分析方法

用 DNASTAR 将阳性克隆测定的正反向序列拼接, 切除两端引物, 经 Clustal X 比对后, 用 DNASP 分析各种群的单倍型多样性  $h$ , 核苷酸多样性  $D_{ij}$ , 基因流  $Nm$  和种群分化度  $F_{ST}$ 。用 Arlequin 软件进行分子变异分析 (AMOVA), 求算种群间及种群内的变异方差分布。

## 作者贡献

杨明照负责实验的设计, 具体实施, 数据处理及论文的撰写, 喻君生负责实验材料的采集, 参与实验的操作, 应站明负责实验材料的采集和论文的修改。

## 致谢

感谢国家自然科学基金(30771763, 30170101)对本研究的资助, 感谢贵州赤水桫欏国家级自然保护区的大力支持, 感谢中山大学苏应娟教授的指导, 感谢王伯荪教授对桫欏的鉴定, 感谢匿名评审专家的意见和修改建议。

## 参考文献

- Avice J.C., eds., 2000, *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge, pp.5-10
- Bennett K.D., 1990, Miankovitch Cycles and their effects on species in ecological and evolutionary time, *Paleobiology*, 16(1): 11-21
- Cheng Z.Y., Tao G.D., and Xu Z.F., 1990, A study on the biological characteristics and the endangering factors of *Alsophila spinulosa*, *Acta Botanica Yunnanica*, 12(2): 186-190 (程志英, 陶国达, 许再富, 1990, 桫欏濒危原因的探讨, *云南植物研究*, 12(2): 186-190)
- Chiang T.Y., Schaal B.A., and Peng C.I., 1998, Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between atpB and rbcL genes of chloroplast DNA, *Bot. Bull Acad. Sinica*, 39: 245-250
- Ferris C., King R.A., Vainola R., Hewitt G.M., 1998, Chloroplast DNA recognizes three refugia sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland, *Heredity*, 80: 584-593
- Huang S., Chiang Y.C., Schaal, B.A., Chou C.H., Chang T.Y., 2001, Organelle DNA phylogeography of *Cycas taitungensis*, a relict species in Taiwan, *Mol. Ecol.*, 10(11): 2669-2681
- Hwang S.Y., Lin T.P., Ma C.S., Lin C.L., Chung J.D., Yang J.C., 2003, Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation, *Mol. Ecol.*, 12: 2689-2695



- Lucansky W., 1974, Comparative studies of the nodal and vascular anatomy in the neotropical Cyatheaceae II. Squamate genera, Amer. Jour. Bot., 61: 472-480
- Lu S.Y., Hong K.H., Liu S.L., Cheng Y.P., Wu W.L., Chiang T.Y., 2002, Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization. Journal of plants research, 115(3): 203-216
- Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M., Rauscher J.T., and Smith W.A., 1998, Phylogeographic studies in plants: problems and prospects, Mol. Ecol., 7(4): 465-474
- Su Y.J., Wang T., Yang W.D., Huang C., and Fan G.K., 1998, DNA extraction and RAPD analysis of *Podocarpus*, Zhong-shan Daxue Xuebao, 37(4): 13-18 (苏应娟, 王艇, 杨维东, 黄超, 范国宽, 1998, 罗汉松属植物 DNA 的提取和 RAPD 分析, 中山大学学报, 37(4): 13-18)
- Treweek S.A., Morgan-Richards M., Russell S.J., derson S., Rurnsey F.J., Pinter I., Barrett J.A., Gibby M., and Vogel J.C., 2002, Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA, Mol. Ecol., 11: 2003-2012
- Tryon R.M., 1970, The classification of Cyatheaceae, Contrib Gray Herb, 200: 3-53
- Willis K.J., McElwain J.C., eds., 2002, The Evolution of Plants, New York, Oxford University Press, pp.22
- Zhang Y.F., Wan L.X., Xu M., and Hou D.B., 2008, A modified CTAB Extraction and inspection for genome of *Aconitum Carmichaeli*, Hubei Agricultural Sciences, 47(1): 12-14 (张岳峰, 万里翔, 徐敏, 侯大斌, 2008, 乌头 DNA 的改良 CTAB 提取和 ISSR 检测, 湖北农业科学, 47(1): 12-14)