

基于 RAPD 的福建产南方红豆杉遗传多样性研究

徐 雯¹, 瞿印权¹, 张玲玲¹, 荣俊冬¹, 何天友², 郑郁善^{1*}

1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002

2. 福建农林大学艺术学院园林学院, 福建 福州 350002

摘 要: 目的 对福建省 23 个不同地理种源的南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* 进行分析, 以揭示其种源和种群的遗传多样性, 为南方红豆杉资源的收集与保护提供一定的理论依据。方法 利用 RAPD 分子标记技术, 对福建省 23 个不同地理种源的南方红豆杉的遗传多样性进行分析。结果 物种水平上的观测等位基因数 (N_a) 为 1.974 4, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.603 8, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.351 3, Shannon 多样性指数 (I) 为 0.522 8。不同种源的南方红豆杉的遗传多样性相对较高。通过对种源和种群的遗传多样性分析, 发现 23 个不同种源的南方红豆杉的遗传距离变化幅度为 0.240 4~0.912 0, 遗传相似度的变化幅度为 0.401 7~0.786 3。7 个不同种群的南方红豆杉群体的遗传距离变化幅度为 0.021 0~0.379 4, 遗传相似度的变化幅度为 0.684 3~0.979 2。根据 Nei 法计算南方红豆杉 7 个种群遗传多样性遗传相似度 (D_{st}) 为 0.108 8, 分化指数 (G_{st}) 为 0.369 0, 基因流系数 (N_m) 为 0.855 0, 总的遗传变异中有 36.9% 的变异存在于群体间, 群体内的变异 63.1%, 种群内存在明显分化。结论 不同种源间的南方红豆杉存在一定的遗传变异, 但不同种群间的南方红豆杉群体的相似度又比较高, 亲缘关系较近。

关键词: 南方红豆杉; RAPD; 遗传多样性; DNA 指纹图谱; 分子标记技术

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)14-2943-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.023

Genetic diversity of *Taxus chinensis* var. *mairei* from Fujian based on RAPD markers

XU Wen¹, QU Yin-quan¹, ZHANG Ling-ling¹, RONG Jun-dong¹, HE Tian-you², ZHENG Yu-shan¹

1. College of forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2. College of Art & Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Objective To reveal the genetic diversity of provenances and populations of *Taxus chinensis* var. *mairei* in Fujian province from 23 origins, providing certain theoretical foundation for the preservation and protection. **Methods** RAPD molecular marker technology was used to study the genetic diversity of *T. chinensis* var. *mairei* in Fujian province. **Results** The number of observed allele was 1.974 4, the number of effective alleles was 1.603 8, the average value of the Nei's genetic diversity was 0.351 3 and the Shannon's information index was 0.522 8. And there existed more accurate information on genetic relationship, diversity among different geographical provenances. The genetic distance of those 23 species ranged from 0.104 to 0.620 7, the genetic coefficients of 23 varieties ranged from 0.401 7 to 0.786 3. The genetic distance of seven *T. chinensis* var. *mairei* of different populations ranged from 0.021 0 to 0.379 4, the genetic coefficients ranged from 0.684 3 to 0.979 2. According to Nei's method calculation of *T. chinensis* var. *mairei*, those seven different populations' genetic diversity was $D_{st} = 0.108 8$, differentiation index $G_{st} = 0.369 0$, and gene flow coefficient $N_m = 0.855 0$. 36.9% of the total genetic variation existed among populations, the variation within populations was only 63.1%, and analysis showed high differentiation existed in provenances. **Conclusion** There is a certain heritable variation among different provenances of *T. chinensis* var. *mairei*, but there still exists more accurate information and high similarity coefficients among different populations.

Key words: *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu; RAPD; genetic diversity; DNA fingerprint molecular marker technology

收稿日期: 2017-01-25

基金项目: 福建省科技创新平台: 福建省中药材 GAP 工程技术研究中心 (2008Y2001)

作者简介: 徐 雯 (1993—), 女, 江苏扬州人, 硕士研究生, 主要从事森林培育理论与技术研究。E-mail: 1243051350@qq.com

*通信作者 郑郁善 (1960—), 男, 福建福州人, 教授, 博导, 主要从事森林培育与园林植物栽培研究。E-mail: zys1960@163.com

南方红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu 又名美丽红豆杉, 我国主要分布在秦岭-淮河以南地区, 是红豆杉属 *Taxus* Linn. 植物分布最为广泛的一种^[1]。由于其是一种珍贵的树种, 其群落经常会遭到人为的干扰与破坏。我国学者对南方红豆杉的生态学特性^[2-4]、群落学特性^[5-7]、繁殖技术^[8-10]、化学成分^[11-13]、药理作用^[14-16]等研究相对比较成熟, 研究报道较多, 而对其遗传学的研究却很少, 所以利用分子标记技术探讨南方红豆杉的遗传学特性, 对保护南方红豆杉尤为重要。

从 20 世纪 80 年代以来, DNA 分子标记技术迅速发展, 目前大约有 10 几种分子标记技术, 较常见的技术有 SSR、RAPD、ISSR、SRAP、RFLP、AFLP、SNP 等, 前 4 种都是基于 PCR 的 DNA 标记^[17-18]。RAPD 技术是由美国科学家 Williams 和 Welsh 于 1990 年分别研究提出的一种基于 PCR 的分子标记技术^[19]。因其具有 DNA 样品用量少, 操作简单易行、分析速度快、易检测、实验成本低等优点, 所以是目前使用最广泛的分子标记技术之一^[20]。

本实验利用 RAPD 技术对福建省 23 个不同地理种源的南方红豆杉进行遗传多样性分析, 旨在为南方红豆杉遗传多样性保护以及优质种源的筛选与保护提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

样本为采集于福建省内 23 个不同地理种源的南方红豆杉单株的嫩梢。每个种源的嫩梢取样 6~8 片, 用变色硅胶干燥的方法保存, 将干燥的材料速带回实验室, 于-80℃超低温冰箱保存。将 23 个不同地理种源的南方红豆杉依次编号 (1~23), 具体见表 1。

1.2 DNA 的提取

南方红豆杉的提取采用杭州博日公司 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Cat#BSC13S1) 法,

并对该方法略作调整, 提取完后用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度。将满足实验条件的 DNA 置于-20℃冰箱保存。

1.3 RAPD-PCR 反应体系及扩增程序与引物筛选

通过翻阅查找红豆杉属植物的 RAPD-PCR 实验资料, 先设计了一个 RAPD-PCR 反应的因素水平 $L_{16}(4^5)$ 正交试验, 初步筛选南方红豆杉 RAPD-PCR 反应体系, 根据正交体系的筛选结果建立初始体系, 再对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、TaqDNA 聚合酶浓度、模板 DNA 浓度进行单因素筛选, 并最终确定每个因素的最佳反应浓度, 在此基础上设计实验筛选最佳退火温度。最终得到优化后的南方红豆杉 RAPD-PCR 反应体系: 20 μ L 的扩增体系中, 2 μ L Mg^{2+} (2.5 mmol/L), 0.4 μ L dNTPs (0.2 mmol/L), 1.2 μ L 引物 (0.3 μ mol/L), 0.2 μ L TaqDNA 聚合酶 (1 U)、模板 DNA 为 30 ng, 体积为 3 μ L、10 $\times$ PCR Buffer 体积为 2 μ L、灭菌 ddH₂O 11.2 μ L。扩增反应程序为 94℃预变 3 min, 94℃变性 45 s, 38℃退火 45 s, 72℃延伸 90 s, 循环 40 次, 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

用优化后的反应体系和扩增程序, 选择任意一份 DNA 样品用 96 条 RAPD 引物进行扩增, 最终筛选出 10 个扩增条带清晰不拖尾, 稳定性较好的引物。

1.4 数据分析

用筛选出的 RAPD 引物对 23 个不同地理种源的南方红豆杉的样品 DNA 进行 PCR 扩增, 对扩增的结果进行记录, 在同一位点上, 有扩增条带的为阳性, 记为“1”; 没有扩增条带的为阴性, 记为“0”。将形成的“0-1”矩阵输入 Excel 表格中。统计出总位点数、多态性位点数, 以及多态性位点百分率 (PPB)。利用 PopGen32 软件对 23 个不同种源的南方红豆杉的遗传多样性进行分析, 计算观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon 多样性指数 (I)、遗传相似度 (D_{st})。并运用 Nei-Li 最长距离法进行聚类分析, 得到 23 个不同地理种源的南方红豆杉的 RAPD 树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 不同引物的 RAPD-PCR 扩增结果多态性分析

本实验从 96 条 RAPD 引物中共筛选出 10 条扩增条带清晰和稳定性较好的引物。引物的碱基序列如表 2 所示。利用筛选出的这 10 条引物对

表 1 药材信息

Table 1 Medicinal information

编号	产地	编号	产地	编号	产地
1	三明	9	龙岩	17	漳平
2	沙县	10	福鼎	18	柘荣
3	仙游	11	闽清	19	松溪
4	大田	12	闽侯	20	浦城
5	福清	13	罗源	21	上杭
6	永安	14	明溪	22	武夷山
7	南平	15	古田	23	永春
8	德化	16	屏南		

表 2 用于 RAPD 分析的随机引物

Table 2 Random primers for RAPD analysis

引物	引物序列 (5'→3')	引物	引物序列 (5'→3')
S15	AGTCAGCCAC	S71	CACACTCCAG
S32	GTCGCCGTCA	S246	TGCCCCGTCGT
S53	CACCGTATCC	S299	GAGGATCCCT
S60	ACCCGGTCAC	S431	GGAAGCTTGG
S69	CTCACCGTCC	S435	CCCAAGGTCC

23 个不同地理种源的南方红豆杉个体的 DNA 样品进行了 RAPD 分析, 为了确保分析结果的有效性, 所有的 PCR 反应至少设置 2 个重复。其扩增结果见表 3。

利用 10 个 RAPD 引物共扩增了 117 个位点, 其中多态性位点 114 个, 占总位点的 97.44%, 片段长度的范围为 200~2 800 bp。每个引物扩增 9~13 个位点, 平均 11.7 个位点。其中多态性位点 7~13 个, 平均 11.4 个。每个引物扩增出来的 PPB 为 77.78%~100.00%。从扩增出来的位点多少, 就可以看出南方红豆杉有丰富的多态性。23 个不同地理种源的南方红豆杉扩增出来的总位点数、多态性位点数以及 PPB 见表 4。其中福清和漳平的 PPB 最低为 22.22%, 闽清的最高为 50.43%, 根据多态位点百分率就可以看出福清和漳平的南方红豆杉适应环境的能力较弱, 闽清的南方红豆杉适应环境的能力相对较强, 总体的遗传多样性偏低。

2.2 种源间的遗传多样性分析

利用 PopGen32 软件对 23 个不同种源的南方红豆杉的遗传多样性进行分析, 结果显示物种水平上的 N_a 为 1.974 4, N_e 为 1.603 8, H 为 0.351 3, I 为 0.522 8。结果表明不同种源的南方红豆杉的遗传多样性相对较高。

表 3 RAPD 引物扩增结果

Table 3 Amplification results of RAPD primers

引物	多态性位点数	总位点数	PPB/%
S15	11	11	100.00
S32	10	11	90.91
S53	13	13	100.00
S60	7	9	77.78
S69	13	13	100.00
S71	12	12	100.00
S246	12	12	100.00
S299	13	13	100.00
S431	11	11	100.00
S435	13	13	100.00

表 4 不同种源南方红豆杉 RAPD-PCR 扩增 PPB

Table 4 Percentage of polymorphic loci within *T. chinensis* var. *mairei* in different provenances by RAPD-PCR amplification

种源编号	总位点数	多态性位点数	PPB/%
1	117	44	37.61
2	117	39	33.33
3	117	47	40.17
4	117	44	37.61
5	117	26	22.22
6	117	35	29.91
7	117	40	34.19
8	117	38	32.48
9	117	48	41.03
10	117	30	25.64
11	117	59	50.43
12	117	47	40.17
13	117	40	34.19
14	117	35	29.91
15	117	45	38.46
16	117	40	34.19
17	117	26	22.22
18	117	37	31.62
19	117	47	40.17
20	117	31	26.50
21	117	28	23.93
22	117	38	32.48
23	117	28	23.93
平均值	117	39	33.15

从 PopGen32 软件分析出来的不同种源的遗传相似性与遗传距离表可以看出 (表 5), 23 个不同种源的南方红豆杉的遗传距离变化幅度为 0.240 4~0.912 0, 遗传相似度的变化幅度为 0.401 7~0.786 3。种内个体间遗传距离越小, 亲缘关系越近, 遗传多样性越低, 反之, 遗传距离越大, 遗传多样性越高。种内个体间遗传相似度越大, 表示亲缘关系越近, 遗传差异越小, 反之遗传相似度越小, 表示亲缘关系越远, 遗传差异越大, 结果表明 23 个不同种源的南方红豆杉之间存在丰富的遗传变异。

对 RAPD 引物扩增出来的基因型的“0-1”的数据矩阵, 运用 DPS7.05 软件中的进行 Nei-Li 最长距离法进行聚类分析, 得出来的 23 个不同地理种源的南方红豆杉的 RAPD 树状聚类图如图 1 所示。

表 5 不同种源的南方红豆杉遗传相似度 (对角线上方) 与遗传距离 (对角线下方)

Table 5 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among different provenances of *T. chinensis* var. *mairei*

种源	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	****	0.598 3	0.632 5	0.623 9	0.658 1	0.666 7	0.641 0	0.538 5	0.555 6	0.623 9	0.512 8	0.649 6	0.606 8	0.615 4	0.649 6	0.606 8	0.658 1	0.564 1	0.632 5	0.615 4	0.589 7	0.606 8	0.692 3
2	0.513 7	****	0.675 2	0.700 9	0.700 9	0.692 3	0.683 8	0.581 2	0.700 9	0.666 7	0.555 6	0.675 2	0.581 2	0.606 8	0.623 9	0.632 5	0.717 9	0.658 1	0.572 6	0.743 6	0.649 6	0.666 7	0.752 1
3	0.458 1	0.392 7	****	0.598 3	0.666 7	0.606 8	0.598 3	0.564 1	0.512 8	0.547 0	0.470 1	0.658 1	0.564 1	0.623 9	0.675 2	0.615 4	0.598 3	0.623 9	0.623 9	0.555 6	0.649 6	0.615 4	0.615 4
4	0.471 7	0.355 5	0.513 7	****	0.675 2	0.581 2	0.726 5	0.606 8	0.555 6	0.658 1	0.564 1	0.649 6	0.709 4	0.717 9	0.666 7	0.709 4	0.675 2	0.649 6	0.598 3	0.735 0	0.589 7	0.606 8	0.675 2
5	0.418 4	0.355 5	0.405 5	0.392 7	****	0.752 1	0.726 5	0.641 0	0.589 7	0.709 4	0.495 7	0.615 4	0.675 2	0.700 9	0.632 5	0.658 1	0.777 8	0.632 5	0.581 2	0.717 9	0.692 3	0.606 8	0.743 6
6	0.405 5	0.367 7	0.499 5	0.542 7	0.284 8	****	0.649 6	0.615 4	0.547 0	0.649 6	0.401 7	0.641 0	0.529 9	0.538 5	0.538 5	0.564 1	0.717 9	0.606 8	0.487 2	0.641 0	0.632 5	0.564 1	0.717 9
7	0.444 7	0.380 1	0.513 7	0.319 5	0.319 5	0.431 4	****	0.555 6	0.692 3	0.743 6	0.495 7	0.717 9	0.641 0	0.666 7	0.632 5	0.589 7	0.658 1	0.632 5	0.581 2	0.717 9	0.572 6	0.623 9	0.692 3
8	0.619 0	0.542 7	0.572 5	0.499 5	0.444 7	0.485 5	0.587 8	****	0.641 0	0.658 1	0.529 9	0.529 9	0.641 0	0.615 4	0.564 1	0.572 6	0.606 8	0.615 4	0.581 2	0.564 1	0.572 6	0.606 8	0.572 6
9	0.587 8	0.355 5	0.667 8	0.587 8	0.528 1	0.603 3	0.367 7	0.444 7	****	0.692 3	0.529 9	0.649 6	0.606 8	0.581 2	0.581 2	0.555 6	0.606 8	0.598 3	0.598 3	0.649 6	0.589 7	0.623 9	0.589 7
10	0.471 7	0.405 5	0.603 3	0.418 4	0.343 3	0.431 4	0.296 3	0.418 4	0.367 7	****	0.529 9	0.717 9	0.692 3	0.735 0	0.649 6	0.675 2	0.709 4	0.700 9	0.632 5	0.717 9	0.641 0	0.641 0	0.726 5
11	0.667 8	0.587 8	0.754 8	0.572 5	0.701 7	0.912 0	0.701 7	0.635 0	0.635 0	0.635 0	****	0.521 4	0.564 1	0.623 9	0.606 8	0.683 8	0.444 4	0.572 6	0.521 4	0.555 6	0.478 6	0.615 4	0.478 6
12	0.431 4	0.392 7	0.418 4	0.431 4	0.485 5	0.444 7	0.331 4	0.635 0	0.431 4	0.331 4	0.651 3	****	0.632 5	0.675 2	0.692 3	0.666 7	0.649 6	0.675 2	0.623 9	0.658 1	0.564 1	0.564 1	0.700 9
13	0.499 5	0.542 7	0.572 5	0.343 3	0.392 7	0.635 0	0.444 7	0.444 7	0.499 5	0.367 7	0.572 5	0.458 1	****	0.735 0	0.752 1	0.709 4	0.675 2	0.615 4	0.615 4	0.649 6	0.675 2	0.675 2	0.623 9
14	0.485 5	0.499 5	0.471 7	0.331 4	0.355 5	0.619 0	0.405 5	0.485 5	0.542 7	0.307 8	0.471 7	0.392 7	0.307 8	****	0.743 6	0.786 3	0.700 9	0.675 2	0.709 4	0.623 9	0.598 3	0.598 3	0.615 4
15	0.431 4	0.471 7	0.392 7	0.405 5	0.458 1	0.619 0	0.458 1	0.572 5	0.542 7	0.431 4	0.499 5	0.367 7	0.284 8	0.296 3	****	0.717 9	0.649 6	0.658 1	0.658 1	0.641 0	0.649 6	0.598 3	0.615 4
16	0.499 5	0.458 1	0.485 5	0.343 3	0.418 4	0.572 5	0.528 1	0.557 5	0.587 8	0.392 7	0.380 1	0.405 5	0.343 3	0.240 4	0.331 4	****	0.709 4	0.649 6	0.615 4	0.615 4	0.606 8	0.692 3	0.641 0
17	0.418 4	0.331 4	0.513 7	0.392 7	0.251 3	0.331 4	0.418 4	0.499 5	0.499 5	0.343 3	0.810 9	0.431 4	0.392 7	0.355 5	0.431 4	0.343 3	****	0.632 5	0.581 2	0.717 9	0.641 0	0.623 9	0.726 5
18	0.572 5	0.418 4	0.471 7	0.431 4	0.458 1	0.499 5	0.458 1	0.485 5	0.513 7	0.355 5	0.557 5	0.392 7	0.485 5	0.392 7	0.418 4	0.431 4	0.458 1	****	0.726 5	0.675 2	0.700 9	0.666 7	0.649 6
19	0.458 1	0.557 5	0.471 7	0.513 7	0.542 7	0.719 1	0.542 7	0.542 7	0.513 7	0.458 1	0.651 3	0.471 7	0.485 5	0.343 3	0.418 4	0.485 5	0.542 7	0.319 5	****	0.538 5	0.615 4	0.615 4	0.615 4
20	0.485 5	0.296 3	0.587 8	0.307 8	0.331 4	0.444 7	0.331 4	0.572 5	0.431 4	0.331 4	0.587 8	0.418 4	0.431 4	0.471 7	0.444 7	0.485 5	0.331 4	0.392 7	0.619 0	****	0.683 8	0.666 7	0.769 2
21	0.528 1	0.431 4	0.431 4	0.528 1	0.367 7	0.458 1	0.557 5	0.557 5	0.528 1	0.444 7	0.736 8	0.572 5	0.392 7	0.513 7	0.431 4	0.499 5	0.444 7	0.355 5	0.485 5	0.380 1	****	0.658 1	0.658 1
22	0.499 5	0.405 5	0.485 5	0.499 5	0.499 5	0.572 5	0.471 7	0.499 5	0.471 7	0.444 7	0.485 5	0.572 5	0.392 7	0.513 7	0.513 7	0.367 7	0.471 7	0.405 5	0.485 5	0.405 5	0.418 4	****	0.641 0
23	0.367 7	0.284 8	0.485 5	0.392 7	0.296 3	0.331 4	0.367 7	0.557 5	0.528 1	0.319 5	0.736 8	0.355 5	0.471 7	0.485 5	0.485 5	0.444 7	0.319 5	0.431 4	0.485 5	0.262 4	0.418 4	0.444 7	****

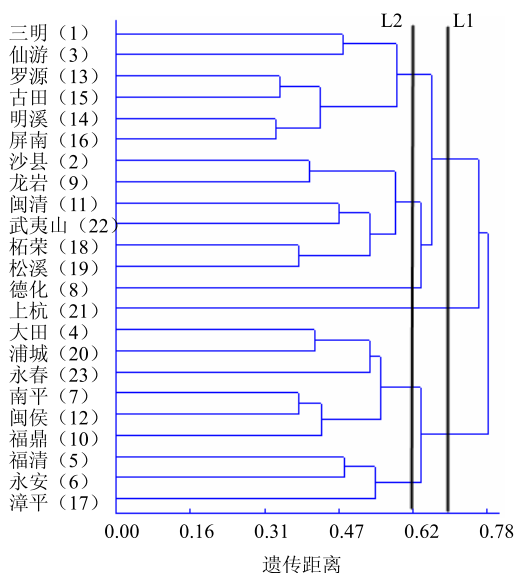


图 1 种源间的聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis among provenances

聚类结果显示, 23 个不同地理种源的南方红豆杉的遗传距离在 0.333 3~0.777 8, 其中明溪和屏南的遗传距离最短为 0.333 3, 三明和古田的遗传距离最长为 0.777 8, 在 L1 处划线 (遗传距离 0.7), 可将 23 个不同地理种源的南方红豆杉分为 3 类: 第 1 类为上杭, 它与其他种源的遗传距离较长; 第 2 类为 (遗传距离 0.658 5): 三明、仙游、罗源、古田、明溪、屏南、沙县、龙岩、闽清、武夷山、柘荣、松溪、德化; 第 3 类为 (遗传距离 0.636 4): 大田、浦城、永春、南平、闽侯、福鼎、福清、永安、漳平。

在 L2 处划线 (遗传距离 0.62), 可将 23 个不同地理种源的南方红豆杉分为 6 类: 第 1 类为上杭; 第 2 类为德化; 第 3 类为 (遗传距离 0.586 2) 三明、游仙、罗源、古田、明溪、屏南; 第 4 类为 (遗传距离 0.581 4): 沙县、龙岩、闽清、武夷山、柘荣、

松溪;第 5 类为(遗传距离 0.551 7):大田、浦城、永春、南平、闽侯、福鼎;第 6 类为(遗传距离 0.541):福清、永安、漳平。

由上面的分析可以看出,遗传距离和聚类分析的结果与种源的地理距离并不存在一致性,这可能与种源地地形、气候等自然因素有关。而且这些种源都采集于种质资源库,南方红豆杉对种质资源库的气候、地形、土壤等条件的适应也会导致个体遗传性状的改变,从而导致聚类分析的结果错综复杂。

2.3 种群间的遗传多样性分析

将 23 个不同地理种源的南方红豆杉按照地级市来划分为 7 个不同种群。在 7 个种群中,种群的 PPB 在 28.21%~40.17%。PPB 最低的是泉州市为 28.21%,最高的是莆田市为 40.17%。平均 PPB 为 33.38%。虽然种群都是在福建省,但不同分布区域的遗传差异还是较大的。利用 PopGen32 软件对 7 个不同种群的南方红豆杉的遗传多样性进行分析,其分析结果见表 6、7。

各个种群的 N_a 的变化幅度为 1.427 4~1.760 7,平均为 1.619 7; N_e 的变化幅度为 1.427 4~1.541 9,

平均为 1.465 0; H 的变化幅度为 0.213 7~0.312 0,平均为 0.267 1; I 的变化幅度为 0.296 2~0.455 7,平均为 0.384 7。物种水平上的 N_a 为 1.974 4, N_e 为 1.445 2, H 为 0.281 2, I 为 0.438 8。其中福州市群体的遗传多样性最高,泉州市的遗传多样性最低。总体而言,南方红豆杉在经历过漫长的自然选择,遗传多样性还是较为丰富的,对环境的适应能力也较强。

7 个不同种群的南方红豆杉群体的遗传距离变化幅度为 0.021 0~0.379 4,遗传相似度的变化幅度为 0.684 3~0.979 2。结果表明 7 个不同种群的南方红豆杉群体的相似度较高,亲缘关系较近。

7 个种群的总基因多样性为 0.294 9,种群内基因多样性为 0.186 1,种群内基因多样性 D_{st} 为 0.108 8,基因分化系数为 0.369 0,基因流为 0.855 0。由结果可知总的遗传变异中有 36.9% 的变异存在于群体间,群体内的变异占 63.1%,种群内存在明显分化。

在结合线 L3 处划线,将 7 个不同种群的南方红豆杉群体划分为 3 类,第 1 类为莆田市,第 2 类为泉州市,第 3 类为三明市、福州市、南平市、宁德市、龙岩市(图 2)。

表 6 不同种群的遗传多样性

Table 6 Genetic diversity of different populations

种群	种源数	PPB/%	N_a	N_e	H	I
三明市	5	33.68	1.700 9	1.523 2	0.292 6	0.424 5
福州市	4	36.75	1.760 7	1.541 9	0.312 0	0.455 7
宁德市	4	32.48	1.572 6	1.435 9	0.243 6	0.352 2
南平市	4	33.33	1.675 2	1.497 4	0.282 1	0.409 9
泉州市	2	28.21	1.427 4	1.427 4	0.213 7	0.296 2
莆田市	1	40.17	****	****	****	****
龙岩市	3	29.06	1.581 2	1.465 0	0.258 3	0.369 9
平均水平	3	33.38	1.619 7	1.481 8	0.267 1	0.384 7
物种水平	23	97.44	1.974 4	1.445 2	0.281 2	0.438 8

表 7 不同种群南方红豆杉的遗传相似度(对角线上方)与遗传距离(对角线下方)

Table 7 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among different populations of *T. chinensis* var. *mairei*

种群	三明市	福州市	宁德市	南平市	泉州市	莆田市	龙岩市
三明市	****	0.979 2	0.964 1	0.971 1	0.967 5	0.741 6	0.969 5
福州市	0.021 0	****	0.973 9	0.975 8	0.943 2	0.724 1	0.971 4
宁德市	0.036 6	0.026 5	****	0.965 8	0.924 9	0.707 1	0.951 0
南平市	0.029 3	0.024 5	0.034 8	****	0.951 7	0.706 0	0.975 0
泉州市	0.033 1	0.058 5	0.078 1	0.049 5	****	0.686 9	0.951 1
莆田市	0.298 9	0.322 8	0.346 6	0.348 2	0.375 6	****	0.684 3
龙岩市	0.031 0	0.029 0	0.050 2	0.025 4	0.050 2	0.379 4	****

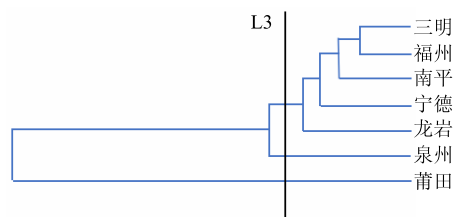


图 2 种群间的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis among populations

3 讨论

陈毓亨等^[21]是我国较早利用 RAPD 分子标记技术对红豆杉属植物进行遗传多样性分析的,王艇等^[22]对红豆杉科 *Taxaceae* 植物进行 RAPD 分析,其研究结果支持南方红豆杉作为红豆杉属的一个变种的处理方式。随后我国越来越多的学者^[23-28]利用 RAPD 分子标记技术对不同的红豆杉属植物进行遗传多样性研究。国外学者 Zamani 等^[29]利用 RAPD 标记方法对欧洲红豆杉 *Taxus baccata* 的遗传多样性进行研究,发现此种方法能够有效地鉴别 2 个非常相近的品种,结果表明,欧洲红豆杉 PPB 为 64.6%。Zarek^[30]同样利用 RAPD 分子标记技术研究了欧洲红豆杉的遗传多样性,结果显示欧洲红豆杉的多态性位点百分率为 69.59%,通过 RAPD 分子标记能够有效地看出欧洲红豆杉种间和种内的遗传变异。除此以外,Collins 等^[31]、Mohapatra 等^[32]等国外学者也利用 RAPD 分子标记技术对不同的红豆杉属植物的遗传多样性进行研究。

本实验对 23 个不同地理种源的南方红豆杉的遗传多样性进行研究,结果显示 23 个不同地理种源的南方红豆杉 PPB 最低为 22.22%,最高为 50.43%,平均 PPB 为 33.15%。与李炎林等^[33]利用 SSR 引物对 8 个南方红豆杉株系进行研究显示的多态性比率为 38.71%相近。物种水平上的 N_a 为 1.974 4, N_e 为 1.445 2, H 为 0.281 2, I 为 0.433 8,与张蕊等^[34]研究结果相似,其研究结果 H 变化幅度为 0.339 3~0.387 3, I 变化幅度为 0.492 6~0.561 5。多种不同的分子标记研究结果都表明不同种源的南方红豆杉的遗传多样性相对较高。

通过对种源和种群的遗传多样性分析,发现 23 个不同种源的南方红豆杉的遗传距离变化幅度为 0.240 4~0.912 0,遗传相似度的变化幅度为 0.401 7~0.786 3,种源间的遗传变异较大。7 个不同种群的南方红豆杉群体的遗传距离变化幅度为

0.021 0~0.379 4,遗传相似度的变化幅度为 0.684 3~0.979 2。与张宏意等^[23]研究出的南方红豆杉 2 个居群间的遗传距离最小的为 0.039 3,最大的为 0.225 8 相似。说明南方红豆杉种群间的遗传变异还是较少的,群体的相似度较高,亲缘关系较近。本实验 RAPD 标记 AMOVA 分析表明,总的遗传变异中有 36.9% 的变异存在于群体间,群体内的变异占 63.1%。张蕊等^[34]的 ISSR 的 AMOVA 结果认为只有 8.75% 的遗传变异存在于群体间,而群体内的遗传变异高达 91.25%。2 种不同的分子标记都表明南方红豆杉的遗传多样性变异的主要来源是群体内,说明群体间的基因交流受限。所以对南方红豆杉的资源收集时,不仅要选择遗传多样性较高的种群,还要注重种群内优良种源、家系和单株的选择。

总体而言,南方红豆杉的种源间的遗传多样性还是比较丰富的,但是种群间的遗传变异比较小,说明其对环境变化的适应能力不是很强。所以要加强遗传多样性较高的种群的保护,注重种群中优良树种的选择与保护以及优质资源的保存,建立种质资源库和优质种子基因库。当然也要注意减少人为的干扰与破坏,避免人为的生境破坏与片段化。只有这样才能更好地保护南方红豆杉的遗传多样性。

参考文献

- [1] 檀丽萍,陈振峰. 中国红豆杉资源 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(6): 113-117.
- [2] 茹文明. 濒危植物南方红豆杉生态学研究 [D]. 太原: 山西大学, 2006.
- [3] 鲁定伟,周要全,李曙波,等. 南方红豆杉生物学、生态学特性及培育技术 [J]. 经济林研究, 2014, 32(4): 159-164.
- [4] 高润梅,石晓东,樊兰英,等. 山西省南方红豆杉自然分布与群落生态学特征 [J]. 应用生态学报, 2016, 27(6): 1820-1828.
- [5] 臧威,孙翔,孙剑秋,等. 南方红豆杉内生真菌的多样性与群落结构 [J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2071-2078.
- [6] 夏鑫,范海兰,洪伟,等. 南方红豆杉群落物种的多样性 [J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(11): 23-26.
- [7] 茹文明,铁军,张桂萍,等. 南方红豆杉群落种间关系的数量分析 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2010, 33(4): 609-614.
- [8] 刘戈飞. 南方红豆杉种质资源调查及繁殖技术研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [9] 孙小霞,梁一池. 南方红豆杉繁殖育苗技术的研究进

- 展 [J]. 林业科技, 2002, 27(4): 9-12.
- [10] 傅瑞树, 黄琦, 胡宗庆. 南方红豆杉扦插繁殖技术研究——I. 基质、季节与生物措施对扦插繁殖的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(2): 37-38.
- [11] 李存芳, 刘勇, 董玫, 等. 南方红豆杉化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1121-1132.
- [12] 苏建, 史红星, 王丽军, 等. 南方红豆杉树皮的化学成分研究 [J]. 中药材, 2014, 37(2): 243-251.
- [13] 王炳义. 南方红豆杉有效成分研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [14] 郑雯. 南方红豆杉和银杏叶响应紫外辐射及土牛膝治疗大鼠关节炎的蛋白质组学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [15] 于金慧. 南方红豆杉聚戊烯醇的分离纯化与抗肝纤维化作用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [16] 徐颖扉, 张晶, 舒琦瑾. 南方红豆杉水提物诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡与紫杉醇抑瘤机制不同的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(6): 1696-1699.
- [17] 方宣钧, 吴为人. 作物 DNA 标记辅助育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [18] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东, 等. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] William J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acid Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [20] 刘建锋, 肖文发, 冯霞. RAPD 技术在珍稀濒危植物遗传多样性研究中的应用 [J]. 林业科学, 2004, 40(3): 156-161.
- [21] 陈毓亨, 白守梅, 程克棣, 等. 南方红豆杉紫杉烷高含量植株系 RAPD 初步研究 [J]. 植物学报, 1999, 41(8): 829-832.
- [22] 王艇, 苏应娟, 黄超, 等. 红豆杉科植物 RAPD 分析及其系统学意义 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(2): 243-249.
- [23] 张宏意, 陈月琴, 廖文波. 南方红豆杉不同居群遗传多样性的 RAPD 研究 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(11): 1993-1996.
- [24] 王贵荣, 李斌连, 高山林. 我国境内几种红豆杉的 RAPD 分析和染色体鉴定 [J]. 药物生物技术, 2005, 12(2): 81-84.
- [25] 茹文明, 秦永燕, 张桂萍, 等. 濒危植物南方红豆杉遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 植物研究, 2008, 28(6): 698-704.
- [26] 苏建荣, 缪迎春, 张志钧. 云南红豆杉紫杉醇含量变异及其相关的 RAPD 分子标记 [J]. 林业科学, 2009, 45(7): 16-20.
- [27] 肖璐, 许明子, 崔苗, 等. 东北红豆杉 RAPD 反应体系的优化 [J]. *Agric Sci Amp Technol*, 2010, 11(3): 47-49.
- [28] 郑超, 别庆铃, 夏冰, 等. 4 种红豆杉属植物遗传多样性和遗传关系的 RAPD 分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22(3): 58-62.
- [29] Zamani S, Abbasian Z, Khaksar G, *et al.* Genomic diversity among yew (*Taxus baccata*) genotypes of Iran revealed by random amplified polymorphism DNA markers [J]. *Inter J Agric Biol*, 2008, 10(6): 648-652.
- [30] Zarek M. RAPD analysis of genetic structure in four natural populations of *Taxus baccata* from southern Poland [J]. *Acta Biol Craco Ser Bot*, 2009, 51(2): 67-75.
- [31] Collins D, Mill R R, Möller M. Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis*, and *T. cuspidata* (*Taxaceae*) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data [J]. *Amer J Bot*, 2003, 90(2): 175-182.
- [32] Mohapatra K P, Sehgal R N, Sharma R K, *et al.* Genetic analysis and conservation of endangered medicinal tree species *Taxus wallichiana* in the Himalayan region [J]. *New Forests*, 2009, 37(2): 109-121.
- [33] 李炎林, 杨星星, 张家银, 等. 南方红豆杉转录组 SSR 挖掘及分子标记的研究 [J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 735-745.
- [34] 张蕊, 周志春, 金国庆, 等. 南方红豆杉种源遗传多样性和遗传分化 [J]. 林业科学, 2009, 45(1): 50-56.