Botanical Research 植物学研究, 2013, 2, 1-5
doi:10.4236/br.2013.21001 Published Online January 2013 (http://www.hanspub.org/journal/br.html)

Genetic Diversity of *Stemona shandongensis* Populations*

Lei Zhang, Yan Ma, Dekui Zang#

Forestry College, Shandong Agricultural University, Taian
Email: #zangdk@sdau.edu.cn

Received: Sep. 7th, 2012; revised: Sep. 15th, 2012; accepted: Sep. 28th, 2012

Abstract: Genetic diversity and genetic structure of 120 individuals of four *Stemona shandongensis* populations were investigated by AFLP method. A total of 282 bands were observed with 8 primer combination, including 137 polymorphic bands. The percentage of polymorphic bands was 48.58%. In species level, Nei's gene diversity index was 0.1441; Shannon's information index was 0.2485; total gene diversity was 0.1646; population gene diversity was 0.1682, gene differentiation coefficient was 0.0210. UPGMA cluster based on AFLP makers was similar to the cluster based on morphological traits; there was no significant correlation between genetic distance and geographic distance. The results showed that there was genetic differentiation among populations, and it could express by morphological characteristics.

Keywords: AFLP; *Stemona shandongensis*; Genetic Diversity; Population

山东百部遗传多样性分析*

张　雷，马　燕，臧德奎#

山东农业大学林学院，泰安
Email: #zangdk@sdau.edu.cn

收稿日期：2012 年 9 月 7 日；修回日期：2012 年 9 月 15 日；录用日期：2012 年 9 月 28 日

摘　要：利用 AFLP 分子标记技术对山东百部 4 个居群 120 个样品进行了遗传多样性分析。8 对引物组合共扩增出 282 条清晰可辨条带，其中多态性条带 137 条，多态性位点百分率 48.58%；在种级水平上，Nei's 基因多样性指数为 0.1441，Shannon 多态性信息指数为 0.2485；居群总遗传多样性(H_t)为 0.1646，居群内遗传多样性为 0.1682，基因分化系数为 0.0210。UPGMA 聚类表明，AFLP 聚类结果与表型分化聚类结果一致，居群间具有一定程度的遗传分化，并通过表型性状表现出来。

关键词：AFLP；山东百部；遗传多样性；居群

1. 引言

山东百部(*Stemona shandongensis*)为百部科百部属植物，与直立百部(*S. sessilifolia*)和蔓生百部(*S. japonica*)近缘，产于山东中部低山丘陵[1-3]，分布区狭窄且受人为干扰严重，已处于濒危状态，应及时采取措施加以保护。因此，开展山东百部的保护生物学研究已极为迫切。分子标记技术已广泛应用于植物居群的遗传结构和遗传多样性分析[4-10]。本研究拟采用 AFLP 分子标记，以居群为单位，通过分析山东百部的遗传多样性水平和遗传结构，探讨影响其遗传多样性和遗传结构的因素，分析濒危原因，并提出保护策略。

2. 材料与方法

2.1. 取样方法

选取济南莲台山、泰山三阳观、淄博大贤山和淄

*基金项目：山东省自然科学基金(Y2006D12)；山东省农业良种工程重大课题(鲁农良字[2010]6 号)。
*通讯作者。

Copyright © 2013 Hanspub

博唐山 4 个保存相对完整的居群，每个居群内随机选取 30 个样品，居群内个体间的采样间距在 30 m 以上以最大限度降低植株间的亲缘关系，保证取样均匀性。选择生长正常，无病虫害的单株，采其新鲜叶片迅速放入装有变色硅胶的封口袋中进行快速干燥，用于 DNA 提取。

2.2. 实验方法

2.2.1. 总 DNA 制备

采用改进的 CTAB 法[11]从硅胶干燥的幼叶中提取总 DNA。

2.2.2. AFLP 分析

利用北京鼎国生物技术公司的试剂盒及其操作指南进行。各样品基因组 DNA 的酶切和接头的连接在同一反应中进行。20 μL 反应体系中含有 DNA 模板 4 μL(50 ng·μL^{-1})，Adapter 1 μL，EcoR Ⅰ/Mse Ⅰ(4 U·μL^{-1})2 μL，10 × Reaction buffer 2.5 μL，ATP(10 mmol·L^{-1})2.5 μL，4 Ligase(4 U·μL^{-1})1 μL，AFLP-Water 7 μL。将上述混合液在 0.5 mL 离心管中混匀离心数秒，37℃保温 5 h，8℃保温 4 h，4℃过夜。

预扩增反应体系为 25 μL。含 Pre-ampmix 1 μL，dNTPs 1 μL，10 × PCR buffer 2.5 μL，Taq DNA polymerase(2 U·μL^{-1})0.5 μL，AFLP-Water 18 μL。预扩增反应程序为：94℃变性 2 min；94℃变性 30 s，56℃复性 30 s，72℃延伸 80 s，循环 30 轮；72℃延伸 5 min。预扩增产物稀释 20 倍，–20℃保存备用。

选择性扩增反应用荧光标记的经过筛选的 8 对引物(表 1)进行选择性扩增。反应体系为 25 μL，含预扩增稀释样品 2 μL，dNTPs 2.5 μL，10 × PCR buffer 0.5 μL，EcoR Ⅰ引物 1 μL，Mse Ⅰ引物(荧光标记)1 μL，TaqDNA polymease(2 U·μL^{-1})0.5 μL，AFLP-Water 17.5 μL。

选择性扩增 PCR 扩增程序按下列参数 PCR 循环：94℃ 2 min；一轮扩增参数：94℃ 30 s，65℃ 30 s，72℃ 80 s；以后每轮循环退火温度递减 0.7℃或 1℃，扩增 12 轮；接着按下列参数扩增 23 轮：94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 80 s；最后延伸 72℃ 5 min。

2.3. 数据处理

取选择性扩增后的样品在 ABI 377 自动测序仪上电泳分离检测，得到 AFLP 的 DNA 指纹图谱。利用 GeneScan 3.1 软件将 8 对荧光引物产生的电泳胶图转换为(0,1)矩阵。根据 PCR 扩增的结果，有带计为 1，无带则计为 0。用 POPGENE version 1.32 软件[12]计算多态性带数、多态性位点百分率(%)、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 多态性信息指数(I)、总遗传多样性(H_t)、居群内遗传多样性(H_s)、基因分化系数(G_{st})、Nei's 遗传一致度(IN)、遗传距离(D)等遗传多样性参数，用 NTSYS2.10 软件[13,14]对 4 个居群进行非加权算术平均法聚类 UPGMA。

3. 结果与分析

3.1. 山东百部的遗传多样性

筛选出 8 对扩增多态性较高、且带形清晰的引物组合，扩增后得到 282 条清晰可辨条带，其中多态性条带 137 条(图 1)，多态性位点百分率为 48.5816%，平均每对引物扩增出 35.25 条带，其中 17.125 条具有多态性。同一引物组合所检测不同位点的遗传多样性程度存在较大的差异(表 1)。扩增带数最多的引物是 E-AGC/M-CAA，为 47 条，带数最少的是引物 E-AGG/M-CAC，为 23 条；多态性检出率最高的是 E-ACA/M-CTC，多态率达 59.0909%，多态性检出率最低的是 E-ACA/M-CAG，多态率为 37.0370%。

8 对引物组合所检测位点的有效等位基因数的范围为1.1137~1.2104；Nei's基因多样性变异范围为0.0738~0.1319；Shannon 信息指数的变异范围为 0.1203~0.2099(表 2)。表明山东百部不同样品间 AFLP 分子标记多态性较高，存在较为丰富的遗传多样性。

多态位点百分率(P)是分子标记中广泛应用的多样性指标。山东百部在物种水平的多态位点百分率为 93.98%，而 4 个居群的多态位点百分率排序为唐山居群(POP4) < 三阳观居群(POP2) < 大贤山居群(POP3) < 莲台山居群(POP1)(表 3)。Shannon 信息指数(I)和 Nei's 基因多样性指数(H)结果则显示，莲台山居群最高，三阳观居群最低，4 个居群的排序为三阳观(POP2) < 唐山(POP4) < 大贤山(POP3) < 莲台山(POP1)。

山东百部居群总遗传多样性(H_t)为 0.1682，居群

Copyright © 2013 Hanspub

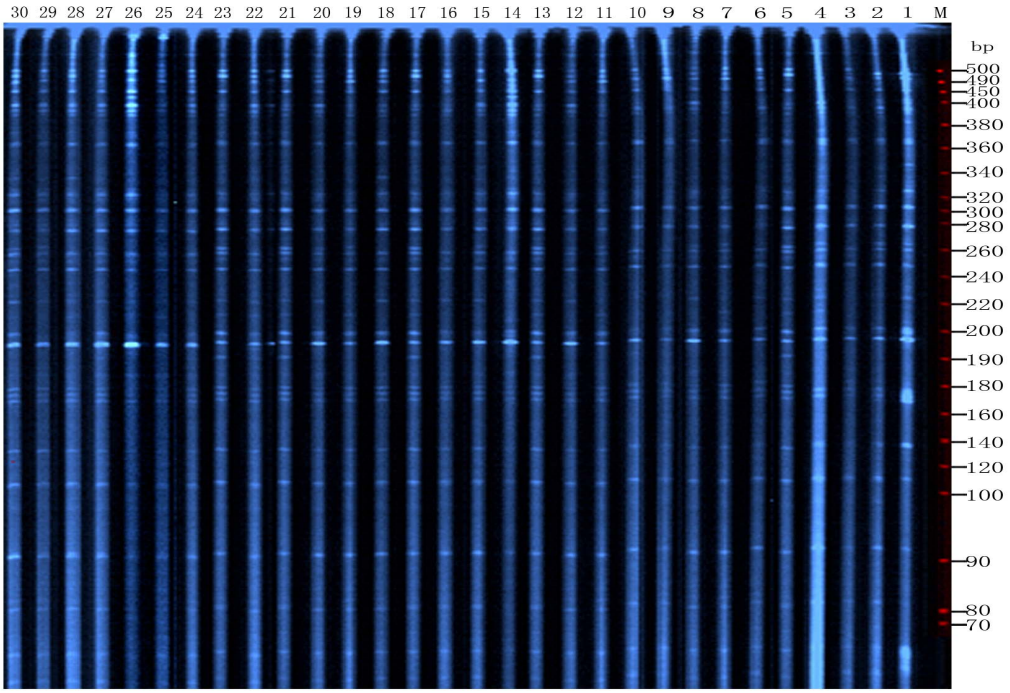

Figure 1. AFLP fingerprinting patterns of Lian Tai-shan *S. shandongensis* population using the primer combination E-ACA/ M-CTC
图 1. 利用 E-ACA/ M-CTC 引物组合对山东百部莲台山居群的 AFLP 扩增图谱

Table 1. Polymorphism of AFLP bands obtained by selective amplification based on the eight primer-combinations
表 1. AFLP 选择性扩增引物产生的条带多态性

序号 No.	引物组合 Primer combination	总带数 Total band number	多态性带数 Polymorphic band number	多态性位点百分率 Polymorphic band percentage (%)
1	E-ACA/M-CTC	44	26	59.0909
2	E-ACG/M-CAA	39	21	53.8461
3	E-AGC/M-CAA	47	24	51.0638
4	E-ACA/M-CAA	40	20	50.0000
5	E-AGC/M-CTA	33	16	48.4849
6	E-AGG/M-CAC	23	9	39.1304
7	E-ACA/M- CAG	27	10	37.0370
8	E-ACG/M-CAG	29	11	37.9310
	合计 Total	282	137	376.5842
	平均 Average	35.25	17.125	48.5816

Table 2. Estimates of genetic diversity of *S. shandongensis* populations (Mean ± SD)
表 2. 山东百部遗传多样性各度量指标(平均值 ± 标准差)

引物组合 Primer combination	观测等位基因数 Observed number of alleles (Na)	有效等位基因数 Effective number of alleles (Ne)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity (H)	Shannon 多态性信息指数 Shannon information index (I)
E-ACA/M-CTC	1.5972 ± 0.4916	1.2104 ± 0.3052	0.1319 ± 0.1695	0.2099 ± 0.2449
E-ACG/M-CAA	1.5278 ± 0.5004	1.1981 ± 0.3073	0.1229 ± 0.1686	0.1946 ± 0.2443
E-AGC/M-CAA	1.5139 ± 0.5010	1.1936 ± 0.2941	0.1217 ± 0.1671	0.1921 ± 0.2449
E-ACA/M-CAA	1.4907 ± 0.5011	1.2090 ± 0.3276	0.1259 ± 0.1764	0.1961 ± 0.2535
E-AGC/M-CTA	1.4861 ± 0.5010	1.1574 ± 0.2858	0.0980 ± 0.1570	0.1571 ± 0.2284
E-AGG/M-CAC	1.4028 ± 0.4916	1.1350 ± 0.2834	0.0814 ± 0.1529	0.1289 ± 0.2209
E-ACA/M- CAG	1.3704 ± 0.4840	1.1137 ± 0.2354	0.0738 ± 0.1363	0.1203 ± 0.2037
E-ACG/M-CAG	1.3704 ± 0.4840	1.1156 ± 0.2300	0.0762 ± 0.1355	0.1244 ± 0.2045

Copyright © 2013 Hanspub

Table 3. Genetic diversity of four *S. shandongensis* populations detected by AFLP (Mean ± SD)
表 3. AFLP 检测山东百部 4 个居群遗传多样性水平(均值 ± 标准差)

居群 Population	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (P)/%	观测等位基因数 Observed number of alleles (Na)	有效等位基因数 Effective number of alleles (Ne)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity (H)	Shannon 多态性信息指数 Shannon information index (I)
POP1	91.67%	1.9167 ± 0.2770	1.2492 ± 0.2770	0.1705 ± 0.1443	0.2848 ± 0.2040
POP2	74.54%	1.7454 ± 0.4367	1.1586 ± 0.2021	0.1158 ± 0.1233	0.2036 ± 0.1857
POP3	78.24%	1.7824 ± 0.4136	1.2359 ± 0.2490	0.1627 ± 0.1432	0.2712 ± 0.2080
POP4	70.83%	1.7083 ± 0.4556	1.1671 ± 0.2039	0.1218 ± 0.1253	0.2117 ± 0.1901
物种水平 Species level	93.98%	1.9398 ± 0.2384	1.2019 ± 0.2233	0.1441 ± 0.1312	0.2485 ± 0.1904

内遗传多样性(H_s)为 0.1646。根据总遗传多样性(H_t)和居群内遗传多样性(H_s)计算不同居群间的遗传分化水平，基因分化系数(G_{st}) 0.0210，即表明总的遗传变异中只有 2.10%的变异存在居群间。

3.2. 居群间遗传一致度和 UPGMA 聚类分析

对山东百部居群 Nei's 遗传一致度(IN)和遗传距离(D)进行计算，结果表明居群遗传一致度 0.9926~0.9969，遗传距离 0.0031~0.0074(表 4)，说明居群间的相似程度较高，遗传距离较小。莲台山(POP1)和三阳观(POP2)遗传相似性最高、遗传距离最小，而莲台山(POP1)和大贤山(POP3)遗传相似性最低、遗传距离最大。根据 Nei's 遗传一致度进行 UPGMA 聚类(图 2)显示，莲台山(POP1)和三阳观(POP2)首先聚为一类，然后与大贤山(POP3)聚为一类，而唐山居群(POP4)单独聚为一类。

Table 4. Genetic distance between populations of *S. shandongensis*
表 4. 山东百部居群间遗传一致度和遗传距离分析

	POP1	POP2	POP3	POP4
POP1	-	0.9969	0.9926	0.9934
POP2	0.0031	-	0.9947	0.9946
POP3	0.0074	0.0053	-	0.9952
POP4	0.0066	0.0054	0.0048	-

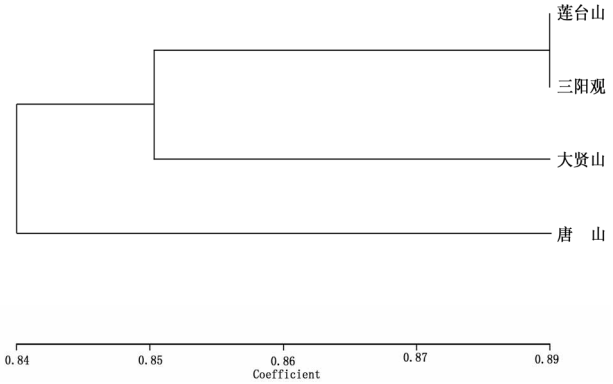

Figure 2. UPGMA cluster of four *S. shandongensis* populations based on AFLP makers
图 2. 山东百部 4 个居群基于 AFLP 分析的 UPGMA 聚类结果

4. 讨论

遗传变异和环境之间的关系一直是植物居群遗传学研究中普遍关注的问题。山东百部 4 个居群除地理和气候差异外，依存的群落类型各不相同，济南莲台山为于黄栌、黄榆混交林，泰安三阳观为麻栎、栓皮栎混交林，淄博大贤山为侧柏疏林，而淄博唐山为刺槐疏林[15]。洪锐民认为通过无性繁殖的植物并不比有性繁殖的植物可遗传变异少，无性繁殖的植物通常在居群内和居群间能保持相当大的变异，环境异质性可能在构建无性繁殖植物居群变异中起重要作用[16]。山东百部既可进行有性繁殖，也可无性繁殖，从其分布特点[17]推断，居群遗传分化主要取决于生境的异质性。

山东百部居群间的 AFLP 聚类结果与表型分化聚类结果[15]一致，表明由于地理隔离，山东百部通过对不同环境长期适应产生了遗传分化，并通过表型性状表达出来。虽然地理距离近的居群能聚类在一起(莲台山和三阳观)，但也出现例外(唐山单独聚为一类)，这说明居群间遗传分化并非由单一因子影响，应该是多因子综合作用的结果。

山东百部居群面积较小，分布区内人为活动频繁，居群片断化趋势明显，若不能有效控制将导致遗传多样性的丧失[18]。因此在保护策略上首应当保护其自然分布区的生境，特别是一些特殊生境的个体。对于分布集中的区域进行封育性保护，减少人为活动干扰，逐步恢复其居群个体数量。

Copyright © 2013 Hanspub

参考文献 (References)

[1] 臧得奎, 彭卫东. 百部属一新种[J]. 植物研究, 1996, 16(4): 413-414.

[2] Z.-H. Ji, B. E. Duyfjes. *E. stemona*. In: Z. Y. Wu, P. H. Raven and D. Y. Hong, Eds., Flora of China, Beijing: Science Press, St. Louis: MBG Press, 2000, 24: 70-72.

[3] 李法曾, 赵遵田, 樊守金. 山东植物精要[M]. 北京: 科学出版社, 2004.

[4] 白音, 包英华, 王文权等. 国产石斛属植物亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1569-1574.

[5] 甘娜, 谭向红, 陈其兵等. 应用 RAPD 标记和细胞质基因组 PCR-RFLP 技术研究大花蕙兰的遗传多样性[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 349-355.

[6] 张春雨, 陈学森, 何天明. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers [J]. 遗传学报, 2007, 34(10): 947-955.

[7] 赵庆芳, 李巧峡, 马世荣等. 青藏高原东部矮生嵩草遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 生态学报, 2006, 26(8): 2494-2501.

[8] 易杨杰, 张新全, 黄琳凯等. 野生狗牙根种质遗传多样性的 SRAP 研究[J]. 遗传, 2008, 30(1): 94-100.

[9] 陈良华, 胡庭兴, 张帆等. 用 AFLP 技术分析四川核桃资源的遗传多样性[J]. 植物生态学报, 2008, 32(6): 1326-1372.

[10] 黄久香, 黄妃本, 许涵等. 海南岛青梅 AFLP 标记的遗传多样性[J]. 林业科学, 2008, 44(5): 46-52.

[11] G. S. H. Fang, R. Grumet. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques, 1992, 13: 52-57.

[12] F. C. Yeh, R. C. Yang and T. Boyle. POPGENE, microsoft windows-based freeware for population genetic analysis release 1.31. Edmonton: University of Alberta, 1999.

[13] M. Nei, W. H. Li. Mathematical model for studying genetic variation interims of restriction Endonucleases. Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of the America, 1979, 76: 5269-5273.

[14] F. J. Rohlf. NTSYS pc2.1: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. New York: Applied Biostatistics Inc., 2000.
http: // www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html.

[15] 张雷, 邱乾栋, 臧德奎. 山东百部的表型分化研究[J]. 山东林业科技, 2009, 5: 29-32.

[16] 洪锐民, 王昱生, 杨建华. 羊草(*Leymus chinensis*)等植物居群克隆表型变异和遗传变异的分子遗传－生态学分析[J]. 东北农业大学学报, 2001, 32(4): 313-319.

[17] 张雷, 邱乾栋, 臧德奎. 山东百部居群的空间分布格局[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(6): 617-621.

[18] Y. Naito, A. Konuma, H. Iwata, Y. Suyama, K. Seiwa, T. Okuda, S. L. Lee, N. Muhammad and Y. Tsumura. Self and inbreeding depression in seeds and seedlings of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). Journal of Plant Research, 2005, 118: 423-430.

Copyright © 2013 Hanspub