

利用荧光 AFLP 标记分析江西省香果树的遗传多样性

Genetic Diversity Analysis of *Emmenopterys henryi* in Jiangxi Province by Fluorescent AFLP Markers

牛艳丽 彭焱松 胡苑 冯晨

(江西省中国科学院庐山植物园, 植物迁地保护与利用江西省重点实验室, 江西九江 332900)

NIU Yanli PENG Yansong HU Wan FENG Chen

(Jiangxi Provincial Key Laboratory of ex Situ Plant Conservation and Utilization,
Lushan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Jiujiang 332900, China)

摘要: 香果树是一种珍稀濒危落叶树种, 具有木材、药用、园林绿化和化工等价值, 但由于过度采伐、旅游业和环境污染等原因, 目前分布区已破碎化、缩小化。本研究运用 AFLP 标记对江西省 4 个香果树居群 64 份材料进行遗传多样性分析。结果表明, 香果树的多态位点百分率为 91.37%, Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别为 0.2731 和 0.4166, 基因流为 3.8028, 表明 4 个群体的遗传多样性水平较高, 且相互间有基因交流。居群水平上, 大围山居群(DWS)的 Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数最高, 其遗传多样性最丰富。AMOVA 分析表明, 遗传变异主要存在于群体内; UPGMA 聚类分析发现, 除武夷山居群(WYS)外, 其他样品在地理位置上没有明显的类群分化; STRUCTURE 和 PCA 聚类分析结果表明, 4 个群体均被划分为 3 个类群。本研究结果可为江西省香果树的保护提供重要的参考依据。

关键词: 香果树; AFLP 标记; 遗传多样性; 种群结构

Abstract: *Emmenopterys henryi* is a rare and endangered deciduous species valued for wood, medical, landscaping and chemical applications. Unfortunately, the current distribution areas of *E. henryi* are fragmented and have diminished, due to overlogging, tourism and pollution on the ecological habitat. In this study, we sampled 64 individuals from four geographical populations in Jiangxi Province and analyzed their genetic diversity by using fluorescent AFLP markers. The percentage of polymorphic loci of *E. henryi* was 91.37%. The Nei's gene diversity index (H) and Shannon's information index (I) were 0.2731 and 0.4166, respectively. The gene flow was 3.8028. These indicated high genetic diversity and genetic exchanges among populations. At the population level, the Daweishan population (DWS) represented the highest diversity. AMOVA results showed that genetic variation mainly existed within population. The cluster analysis by UPGMA showed clear geographical grouping except for Wuyishan population (WYS). Notably, both STRUCTURE and PCA analyses consistently divided four populations into three genetic groups. These findings can provide an important reference for the effective protection of *E. henryi* in Jiangxi Province.

Keywords: *Emmenopterys henryi*; AFLP Marker; Genetic Diversity; Population Structure

基金项目: 中国科学院战略生物资源计划植物种质资源创新平台项目(KFJ-BRP-007-013)。

第一作者简介: 牛艳丽(1978—), 女, 濒危植物种质保存、研究与利用。邮箱: niuyli@lsbg.cn。

通讯作者: 冯晨(1990—), 男, 湖南岳阳人, 副研究员, 研究方向为作物遗传育种和保育遗传。邮箱: fengc@lsbg.cn。

珍稀濒危植物是野生植物中最脆弱的群体,一种植物的灭绝不仅意味着其基因、文化和科学价值的丧失,还会引发 10~30 种其他生物的灭绝,打破生态系统的稳定。生物多样性丧失已经成为全球环境问题之一, Pitman 等指出,到 21 世纪末,将有 2/3 的高等维管植物消失,而珍稀濒危植物是生物多样性保护和研究的重要对象(田瑜等, 2024)。珍稀濒危植物遗传多样性研究是保护生物学的核心内容之一,通过对珍稀濒危植物遗传多样性的研究,不仅可以清楚地了解珍稀濒危植物的进化历史,而且可以为珍稀濒危植物遗传多样性的研究提供科学的依据。

香果树 (*Emenopterys henryi*) 为茜草科 (Rubiaceae) 香果树属 (*Emenopterys*) 落叶大乔木,是中国特有的单种属和第四纪冰川孑遗植物之一(郭连金等, 2009)。香果树原产于中国亚热带,主要分布在暖温带落叶林的不连续的山区山谷中。其树形优美,花朵大,蒴果红色,有特殊的香气,可用于园林绿化,也有药用价值(胡红泉等, 2011)。由于气候变化和人类活动等因素,其自然栖息地遭到破坏,现已被列为国家二级保护野生植物(李钧敏等, 2004; 郭连金等, 2009)。

为了拯救该珍稀濒危物种,国内外学者从分布格局(王磊等, 2024; Ma et al., 2019)、种群结构(郑子洪等, 2023)、种苗繁育特性(陈茂光等, 2019)及植物形态与生理特性(程薪宇等, 2025)等多个角度进行了研究。近年来,关于香果树的保护生物学逐渐受到重视(郑子洪等, 2022)。在已有的研究中,早期主要侧重对 RAPD、ISSR、AFLP 和 SSR 等分子标记的开发(李钧敏等, 2004; 张文标等, 2007), Zhang 等(2016)采用 AFLP 分子标记开展了较大尺度的香果树群体遗传多样性和遗传结构的分析,但该研究对江西省的香果树样品

采集不全面。AFLP 标记已有效地用于许多物种的生物多样性分析(Sharma et al., 2000; Hasbún et al., 2012; Tang et al., 2016; 张秋璐等, 2025),遗传连锁图谱(Wang et al., 2014),基因作图(Bhattacharyya et al., 2017),种质鉴定(Tagane et al., 2012)和分子标记辅助育种(Wang et al., 2011)。荧光 AFLP 标记(Huang et al., 1999)比银染技术更适合遗传多态性分析,它克服了传统聚丙烯酰胺凝胶电泳效率低、难以准确读取片段、不能有效整合不同批次大规模样品 DNA 指纹鉴定数据的缺点。本研究利用荧光 AFLP 标记技术对江西省现有已知的 4 个居群 64 个样品进行了遗传多样性和遗传结构分析,为进一步开展江西省的香果树保护提供了重要信息。

1 材料与方法

1.1 植物材料

用于遗传多样性研究的材料来自江西省武夷山国家级自然保护区(WYS)、井冈山国家级自然保护区(JGS)、铜鼓县花山(HS)和宜丰县大围山(DWS)的 4 个居群的 64 份样本,每个居群两个样本间距至少 100m。凭证标本保存于庐山植物园植物标本馆。

1.2 基因组 DNA 提取和 AFLP 分析

使用改良的 CTAB 法(Chen et al., 2014)提取基因组 DNA。使用分光光度计(Nano Drop 2000, Thermo Scientific)验证 DNA 的浓度和质量。将 DNA 浓度调整至 20ng/μl,随后在 -20℃ 下储存。采用 *EcoR* I/*Mse* I 双酶切类型的 AFLP 技术(美国新英格兰生物实验室有限公司)进行了扩增片段长度多态性分析。酶切与连接反应同步,引物 *Mse* I 为 FAM 荧光标记,操作步骤参照操作指南,扩增产物检测参照 Yuan 等(2007)方法。

表 1 香果树野外采样样品信息一览表
Table 1 List of *Emmenopterys henryi* samples in this study

群体编码 Population code	个体数量 Number of samples	生境 Habitat	经纬度 Latitude(N)/Longitude(E)	海拔 Altitude (m)	来源 Provenance
HS	11	密林、路边	N28°32'/E114°12'	452~754	铜鼓县花山
DWS	20	密林、溪边	N28°27'/E114°12'	767~1136	宜丰县大围山
WYS	14	密林、溪边	N27°49'/E117°44'	1192~1438	铅山县武夷山
JGS	19	密林、路边及开阔地带	N26°37'/E114°11'	598~883	吉安市井冈山

1.3 数据分析

用 POPGENE 1.32 计算多态位点百分率(percentage of polymorphic loci, PPL)、多态位点数(number of polymorphic loci, NP)、有效等位基因数(effective number of alleles, *Ne*)、观测等位基因数(number of alleles, *Na*)、香农信息指数(Shannon's information index, *I*) 和 Nei's 基因多样性指

数(Nei'sgene diversity index, *H*)。用 NT-SYS-PC 2.10 软件计算遗传相似性,用 UPGMA 对样本进行聚类分析。用 R 语言 FactoMineR 包进行香果树遗传背景主成分分析(PCA),用 STRUCTURE 软件(Pritchard et al., 2000)分析群体遗传结构。居群间的显著性差异分析用 GenAlEx v6.5 软件(Peakall et al., 2012)(表 2)。

表 2 香果树 AFLP 有效引物组合的多态性
Table 2 Polymorphism of different AFLP primers in four*Emmenopterys henryi* populations

引物编号 Primers	观察等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	Nei's 基因多样 性指数 <i>H</i>	香农信息指数 <i>I</i>	多态性位点数 NP	多态性位点比例 (%) PPL
E32M85	1.9886±0.1066	1.5248±0.3152	0.3148±0.1462	0.4791±0.1836	87	98.86
E35M49	1.9767±0.1516	1.5333±0.3387	0.3124±0.1648	0.4703±0.2134	84	97.67
E39M54	2±0	1.5048±0.3476	0.2972±0.1703	0.4506±0.2207	81	100
E41M56	2±0	1.4903±0.3367	0.2928±0.1647	0.4475±0.2112	73	100
E45M59	1.9890±0.1048	1.6359±0.2945	0.3654±0.1334	0.5399±0.1669	90	98.90
E49M56	2±0	1.5106±0.3404	0.3016±0.1659	0.4580±0.2120	75	100
E59M64	1.9579±0.2019	1.5183±0.3209	0.3090±0.1575	0.4672±0.2068	91	95.79
E78M72	1.9872±0.1132	1.5122±0.3603	0.2989±0.1710	0.4539±0.2165	77	98.72
E85M84	1.9620±0.1924	1.4934±0.3154	0.2990±0.1535	0.4568±0.1995	76	96.20
E86M85	1.9870±0.1140	1.5439±0.3357	0.3192±0.1566	0.4819±0.1968	76	98.70
Mean	1.9842±0.1248	1.5285±0.3308	0.3120±0.1587	0.4717±0.2034	81	98.42

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增条带多态性

用 10 对 *EcoRI*/*MseI* 引物对 64 份样品进行扩增,共扩增出 810 个片段。平均多态性位点比例为 98.42%;不同引物对扩增出的片段数为 73~91,多态性位点百分率

为 95.79%~100%。有 3 对引物(E39M54、E41M56、E49M56)多态性位点比例为 100%。引物对 E45M59 的扩增效率最高,其多态性位点数、多态性位点百分率、香农信息指数和 Nei's 基因多样性指数分别为 90, 98.90%、0.5399 和 0.3654;而引物对 E41M56 的扩增效率最低,对应的指数分别

为 73、1.4903、0.2928 和 0.4475。

2.2 遗传多样性分析

DWS 群体的遗传多样性最高, 观测等位基因数和有效等位基因数分别为 1.7582 和 1.4371, 其香农信息指数和 Nei's 基因多样性指数为 0.3813 和 0.2544, 多态性位点数和百分率为 624 和 75.82%(表 3)。其次是 JGS 群体 ($N_a = 1.7424$, $N_e = 1.4275$, $H = 0.2498$, $I = 0.3746$) 和 HS 群体 ($N_a = 1.7023$, $N_e = 1.4262$, $H =$

0.2462, $I = 0.3670$)。WYS 群体遗传多样性最低 ($N_a = 1.6330$, $N_e = 1.3703$, $H = 0.2155$, $I = 0.3226$)。江西省香果树多态性位点数和多态性比例为 752 和 91.37%, 4 个居群平均多态性位点数和平均多态性比例为 584 和 70.90%; 江西省香果树其他遗传多样性参数和各居群遗传多样性平均值分别为 $N_a = 1.9137$, $N_e = 1.4601$, $H = 0.2731$, $I = 0.4166$ 和 $N_a = 1.7479$, $N_e = 1.4153$, $H = 0.2415$, $I = 0.3614$ 。

表 3 江西省香果树群体的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters revealed by AFLP markers on *Emmenopterys henryi* populations in Jiangxi Province

群体编码 Population code	观察等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Nei's 基因多样 性指数 H	香农信息指数 I	多态性位点数 NP	多态性位点比例 (%) PPL
HS	1.7023±0.4575	1.4262±0.3812	0.2462±0.1995	0.367±0.2792	578	70.23
DWS	1.7582±0.4284	1.4371±0.3744	0.2544±0.194	0.3813±0.2695	624	75.82
WYS	1.633±0.4823	1.3703±0.3784	0.2155±0.201	0.3226±0.2843	521	63.3
JGS	1.7424±0.4376	1.4275±0.3708	0.2498±0.194	0.3746±0.2712	611	74.24
Mean	1.7479±0.4146	1.4153±0.3762	0.2415±0.1971	0.3614±0.2761	584	70.9
Specieslevel	1.9137±0.2809	1.4601±0.3544	0.2731±0.1758	0.4166±0.2339	752	91.37

AMOVA 分析结果表明, 大部分 (89%) 的遗传变异发生在居群内。群体间的遗传变异差异不显著 ($P = 0.109$)。基于 Nei's 基因多样性的群体间基因差异分化系数数值为 0.1162, 说明群体之间存在有限的遗传分化, 基因流为 3.8028, 说明 4 个群体之间存在一定程度的基因交换。

2.3 聚类 and 主成分分析

由基于遗传距离的 UPGMA 聚类 (图 1) 可知: WYS 群体的 14 个样本聚为一组, 其余 50 个样本未按群体划分进行聚类, 而是在各居群内表现出混杂的格局, 说明其余 3 个群体间基因交流更多, 该结果得到了基因流 N_m 值的支持 (表 4)。HS 群体

中, 除 HS8 样本外, 其余 11 个样本聚为一组。DWS 群体的部分样本与 JGS 群体聚为一组, 另一部分样本与 WYS 群体聚为一组。地理距离最近的 HS 群体和 DWS 群体没有聚为一组。

利用 FactoMineR 软件对 64 份样品进行基于遗传相似性矩阵的主成分分析 (PCA), 结果与其 UPGMA 聚类分析结果存在差异。在 AFLP 标记的 PCA 图中, 前两个主成分分别解释总变异的 5.28% 和 4.57% (图 2), 所有样品被分为三组, 但各群体没有被显著区分, 仅 JGS 群体和 DWS 群体大多样品各聚为一组。

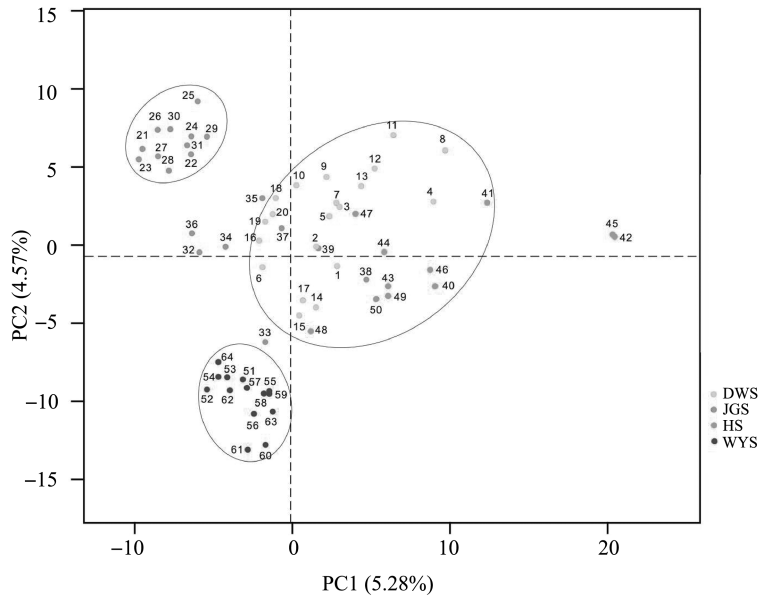


图 2 江西省香果树居群的主成分分析

Fig. 2 PCA of 64 *Emmenopterys henryi* samples in Jiangxi Province based on AFLP markers

2.4 群体遗传结构分析

经 STRUCTURE 软件计算发现, $\ln P(D)$ 值随 K 值持续上升(图 3a), 当 $K=3$ 时, ΔK 值最大(图 3b), 由此推断群

体结构 K 值为 3 较为合理。64 份样本被分为 3 个类群(图 3c), 这与 PCA 结果是一致的。群体结构划分与地理分布不完全一致。

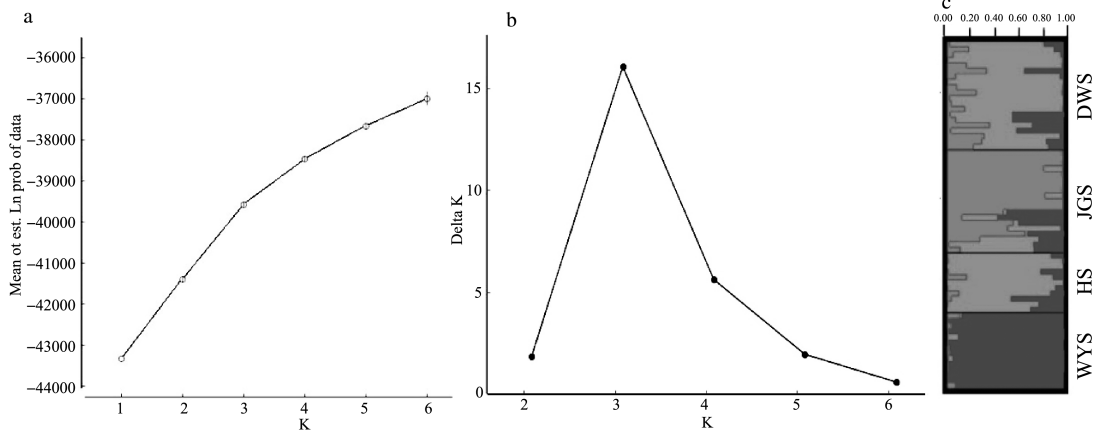


图 3 基于 AFLP 的 4 个江西省香果树居群的遗传结构分析

Fig. 3 Structure analysis with four *Emmenopterys henryi* populations in Jiangxi Province using AFLP markers

3 讨论

遗传多样性是指一个物种的遗传组成中的总的遗传特征, 对物种的生存和适应

起着至关重要的作用 (Given, 1994), 它对于森林生态系统的长期稳定和短期生产力来说是不可或缺的, 是可持续森林管理的一个基本要素 (Young et al., 2000;

Minn et al., 2016)。而遗传多样性分析可为有效保存、评价和利用香果树种质资源提供重要的理论依据。本研究利用荧光 AFLP 分子标记技术揭示了香果树的遗传多样性,为珍稀濒危植物资源的有效保护和科学开发利用提供了策略。

对于濒危物种而言,遗传变异是种群进化的必要条件,遗传多样性高的物种是保护的基本单位,而遗传多样性低的物种则普遍存在于分布范围相对狭窄的濒危和特有物种中(Ross et al., 2016)。香果树是个广布种,环境异质性高,狭窄的分布也增加了遗传隔离、遗传漂变和遗传突变的可能性(Cao et al., 2016)。但是野外调查结果表明,香果树种群分布较为分散,种群流失严重,DWS 种群是目前江西省最大的香果树群落。在遗传多样性丰富的地区应建立新种群,以防止人类活动造成遗传污染。本研究利用 10 对 AFLP 引物进行的遗传多样性分析表明,香果树在种水平上具有较高的遗传多样性,居群间存在一定的遗传分化,基因流 Nm 值(3.8028)暗示香果树居群间存在一定程度的基因交换。

参考文献

- 陈茂光,郭连金,余诺祎,等,2019. 林下枯落物浸提液对香果树种子萌发及幼苗生长影响的变化效应[J]. 陕西林业科技, 47(4): 1-7.
- 程薪宇,程霖锐,陈寒瑶,等,2025. 香果树幼苗低温胁迫下的生理响应与适应机制[J]. 西北林学院学报. <http://link.cnki.net/urlid/61.1202.S.20250422.1817.002>.
- 郭连金,李梅,2009. 濒危植物香果树武夷山种群分布格局分形分析[J]. 西北植物学报, 29(5): 1033-1039.
- 胡红泉,崔同林,2011. 珍稀树种香果树的利用高价值及实用繁殖技术[J]. 中国林副特产, 6: 36-37.
- 李钧敏,金则新,2004. 香果树 RAPD 扩增条件的优化及遗传多样性初步分析[J]. 福建林业科技, 31(2): 36-40.
- Zhang 等(2016)采用 BAPS 软件将 37 个群体划分为 9 组,但并未对分组后的遗传组别进行分析,且对江西省香果树的种群取样不全面。本研究中 STRUCTURE 检测和 UPGMA 聚类图显示,群体结构划分与地理分布不完全一致,这可能与样本遗传背景复杂有关。两种聚类的结果相似,即 64 份样品来源于 3 个基因池(图 3c),表明样品之间存在一定的基因共享。较大的基因流避免了遗传漂变引起的居群间基因分化,居群间的基因流通常是通过花粉、种子、孢子和其他能携带遗传物质的东西(如昆虫)进行的。香果树属异花授粉,不存在不忠实的传粉者。香果树群体分布分散,传粉不足,雨水造成自然育性低,该物种的授粉不成功和其他未知因素是该物种濒危的原因。地理隔离在驱动该物种种群遗传分化方面可能发挥了主导作用(Zhang et al., 2016)。因此,我们在实验和迁地资源保护中,应尽可能收集更多的研究个体,这将有助于提高迁地种群的遗传代表性。本研究结果可为江西省香果树的保护提供重要参考依据。
- 田瑜,李俊生,2024.《昆明-蒙特利尔全球生物多样性框架》“3030”目标的内涵及实现路径分析[J]. 生物多样性, 32(6): 145-158.
- 王磊,周鹏,陈亚辉,2024. 基于 MaxEnt 模型的华东地区香果树地理分布预测[J]. 江苏林业科技, 51(4): 41-47.
- 张秋璐,曹翠萍,舒芬芬,等,2025. 基于 AFLP 的安徽省黄连木遗传多样性[J]. 中南林业科技大学学报, 45: 181-190.
- 张文标,金则新,李钧敏,2007. 濒危植物香果树自然居群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 浙江大学学报, 33(1): 61-67.
- 郑子洪,郭小华,包小梅,等,2023. 浙江九龙山香果树群落乔木层物种的多样性格局[J]. 热带亚热带植物学报, 31(4): 455-464.
- 郑子洪,郑伟成,郑蓉,等,2002. 香果树保护生物学研究进展[J]. 浙江林业科技, 42: 94-101.
- BHATTACHARYYA P, GHOSH S, MANDI S S,

- et al. , 2017. Genetic variability and association of AFLP markers with some important biochemical traits in *Dendrobium thyrsiflorum*, a threatened medicinal orchid[J]. South African Journal of Botany, 109: 214–222.
- CAO Y N, COMES H P, SAKAGUCHI S, et al. , 2016. Evolution of East Asia's Arcto-Tertiary relict *Euptelea* (Eupteleaceae) shaped by Late Neogene vicariance and Quaternary climate change[J]. BMC Evolutionary Biology, 16: 66.
- CHEN C, QI Z C, XU X H, et al. . 2014. Understanding the formation of Mediterranean-African disjunctions: evidence for Miocene climate-driven vicariance and recent long-distance dispersal in the Tertiary relict *Smilax aspera* (Smilacaceae)[J]. New Phytologist, 204: 243–255.
- GIVEN D R, 1994. Principles and practice of plant conservation[M]. Chapman & Hall, London.
- HASBÚN R, ITURRA C, MORAGA P, et al. , 2012. An efficient and reproducible protocol for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection [J]. Tree Genetics & Genomes, 8: 925–931.
- HUANG J, SUN M, 1999. A modified AFLP with fluorescence - labelled primers and automated DNA sequencer detection for efficient fingerprinting analysis in plants [J]. Biotechnology Techniques, 13: 277–278.
- MA M, WU Y, ZHANG Y, et al. , 2019. Sprouting as a survival strategy for non - coniferous trees: Relation to population structure and spatial pattern of *Emmenopterys henryi* (Rubiaceae) [J]. Acta Ecologica Sinica, 39: 1–8.
- MINN Y, GAILING O, FINKELDEY R, 2016. Genetic diversity and structure of teak (*Tectona grandis* L.f.) and dahat (*Tectona hamiltoniana* Wall.) based on chloroplast microsatellites and Amplified Fragment Length Polymorphism markers[J]. Genet Resour Crop Evol, 63: 961–974.
- PEAKALL R, SMOUSE P E, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update [J]. Bioinformatics, 28: 2537–2539.
- PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. Genetics, 7: 574–578.
- ROSS A A, TRAVERS E S, 2016. The genetic consequences of rarity in the western prairie fringed orchid (*Platanthera praeclara*) [J]. Conservation Genetics, 16: 69–76.
- SHARMA A, SHARMA R, MACHII H, 2000. Assessment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 101: 1049–1055.
- TAGANE S, PONRAGDEE W, SANSAYAWICHAI T, et al. , 2012. Characterization and taxonomical note about Thai *Erianthus* germplasm collection: the morphology, flowering phenology and biogeography among *E. procerus* and three types of *E. arundinaceus*[J]. Genet Resour Crop Evol 59: 769–781.
- TANG H X, XING S Y, LI J H, et al. , 2016. Genetic diversity of Ginkgo biloba half-sib families based on AFLP technology[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 68: 58–65.
- WANG D W, LI Y, LI L, et al. , 2014. The first genetic linkage map of *Eucommia ulmoides* [J]. J Genet. , 93(1): 13–20.
- WANG D W, LI Y, LI Z Q, 2011. Identification of a Male-Specific Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and a Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) Marker in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Int J Mol Sci, 12(1): 857–864.
- YOUNG A G, BOSHIER D, BOYLE T J B, 2000. Forest conservation genetics principles and practice[M]. CSIRO Pub, Collingwood.
- YUAN Z H, YIN Y L, QU J L, et al. , 2007. Population genetic diversity in chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars revealed by fluorescent-AFLP markers[J]. Journal of Genetics and Genomics, 34(12): 1061–1071.
- ZHANG Y H, WANG I J, COMES H P, et al. , 2016. Contributions of historical and contemporary geographic and environmental factors to phylogeographic structure in a Tertiary relict species, *Emmenopterys henryi* (Rubiaceae) [J]. Scientific Reports, 6: 24041.