

## 华中特有珍稀植物裸芸香的 AFLP 遗传多样性分析

杨佳<sup>1,2</sup>, 李晓东<sup>1</sup>, 李新伟<sup>1</sup>, 史全芬<sup>1</sup>, 李建强<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 浙江大学现代农业研究示范中心, 杭州 310029)

**摘要:** 采用选择性扩增片段多态性(AFLP)方法对华中特有单种属植物裸芸香(*Psilopogon sinense*)的8个自然居群的遗传多样性进行了检测与分析。结果表明:裸芸香的遗传多样性较低,且居群内遗传多样性显著低于物种水平遗传多样性。筛选出的5对引物共得到180个位点,76个为多态位点,多态位点百分率为42.2%,8个居群多态位点百分率为:3.3%~16.7%,居群平均多态位点百分率为9.4%;8个居群 Nei 多样性指数为0.01987~0.06987, Shannon's 多样性指数为0.0197~0.0816。居群间分化系数  $G_{ST}$  = 0.5069,居群间基因流为0.2432,不足以维持居群间的基因交流及现有的遗传结构。AMOVA 分析表明总遗传变异的13.17%存在于4个地理区域之间,50.45%存在于地理区域内的居群间,36.38%的遗传变异存在于居群内个体间。NTSYS 分析表明遗传距离与地理距离不存在相关关系。UPGMA 聚类结果表明长江南北两岸的居群并没有产生明显分化。最后,分析了裸芸香的濒危原因并提出了有效的保育措施。

**关键词:** *Psilopogon sinense*; AFLP; 三峡库区; 遗传变异; 濒危机制; 保育策略

**中图分类号:** Q949.752.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-470X(2007)03-0226-09

## Analysis of AFLP Variation of the Endemic and Rare Species *Psilopogon sinense* in Central China

YANG Jia<sup>1,2</sup>, LI Xiao-Dong<sup>1</sup>, LI Xin-Wei<sup>1</sup>, SHI Quan-Fen<sup>1</sup>, LI Jian-Qiang<sup>1\*</sup>

(1. Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Modern Agriculture Research and Demonstration Center, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** AFLP variation of 164 individuals of eight natural populations of *Psilopogon sinense*, an endemic and rare plant of Central China, was analyzed to investigate the genetic variation and genetic structure of the species. A moderate low genetic diversity was observed in the species and average variation of populations significantly lower than the variation of species level. A relatively low level of genetic diversity was observed in the species, and the genetic diversity within populations was significantly lower than that within the species. Five AFLP primers produced 180 bands, of which 76 were polymorphic, accounting for 42.2%. The percentage of polymorphic bands of eight natural populations was 3.3%~16.7%, respectively, with an average percentage of 9.4%. The Nei's gene diversity of eight natural populations was 0.01987~0.06987 and the Shannon's Information Index was 0.0197~0.0816. Average of Nei's gene diversity was 0.03420, and average of Shannon's Information Index was 0.0510. They were all lower than the average of species of the world level, but were higher than the average of the endemic species level. The average of Nei's gene diversity and Shannon's Information Index was 0.03420 and 0.0510 respectively, which were lower than the average of species in the world level but higher than the average of endemic species. In addition,  $G_{ST}$  was 0.5069, which indicated that high population differentiation occurred. Analysis of molecular variance (AMOVA) of 164 individual revealed that 13.17% genetic variation was among the populations of four geographical regions and 50.45% genetic variation among the populations within the four regions; and 36.38% of total variance was distributed within populations.  $N_m$  was 0.2432, which implied that the gene flow was not enough to maintain gene exchange and current genetic structure. The result of UPGMA cluster showed that eight natural populations were genetically clustered in two groups, of which one was Yanduhe population and the other included the remaining seven populations. Mantel analysis of NTSYS indicated that genetic divergence was not correlated with geographical distance. At last, we analyzed the cause why *P. sinense* was

收稿日期:2007-01-12,修回日期:2007-02-08。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370101,30370153);中国科学院方向性项目(KSCX2-SW-104)。

作者简介:杨佳(1979-),女,硕士,从事遗传学相关研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: jianqiangl@hotmail.com)。

endangered, and we concluded two main factors as follows. One was low genetic diversity that maybe due to bottleneck effect, inbreeding depression and the absent of natural selection, the other cause of population decline of *P. sinense* appeared to be from human disturbance. In correspondent with this, we proposed some effective strategies to conserve the species.

**Key words:** *Psilopeganum sinense*; AFLP; The Three-Gorge Reservoir Area; Endangered mechanism; Genetic variation; Conservation strategies

研究物种的遗传多样性对于保护遗传学研究具有基础性作用,为了合理有效地开展保护遗传学研究,首要的一步是了解并保护物种的遗传多样性<sup>[1,2]</sup>,而对于特有稀有物种遗传多样性的研究则具有更为深远的意义。其遗传多样性的丧失不仅仅使我们可能丧失对生物进化历史进程进行深入探讨的机会,更重要的是,使生物对未来环境适应性降低并因此而导致灭绝,从而使人类进一步发展所依托的生物资源不复存在<sup>[3]</sup>。

裸芸香(*Psilopeganum sinensis*)是我国特有单种属植物,隶属于芸香科(Rutaceae)裸芸香属,为多年生短命草本植物<sup>[4]</sup>,主要分布于湖北的巴东、兴山、宜昌、宜都,重庆的武隆、巫溪、巫山、武陵、新乡(武陵和新乡为本次调查中新发现的居群)以及贵州等地。裸芸香是一种重要的药用植物<sup>[5]</sup>,主治感冒发烧、支气管炎、跌打损伤,其叶果可作为香料原料提取芳香油。

裸芸香分布范围狭窄,主要分布在三峡库区及周边地区,自然资源数量有限,被列为湖北省第二批国家珍稀濒危保护植物。目前三峡库区已蓄水到150 m,秭归香溪居群和巫山居群已被淹没,因而对其制定有效保育措施刻不容缓。居群遗传结构及其影响因子是制定物种有效保育策略和措施的依据<sup>[6-8]</sup>,物种的成功保育,在于保育物种的基因库,最大限度保存其遗传多样性,以提供物种应对环境变迁和持续进化的潜力<sup>[9]</sup>。由此可见,要对裸芸香实施有效保护,首先要明确其遗传基础。而以往的研究多集中于化学成分分析<sup>[10,11]</sup>,对其遗传多样性的研究很少<sup>[12]</sup>。为了制定科学有效的保育策略,了解物种自然居群的遗传多样性是至关重要的<sup>[13,14]</sup>。本研究采用AFLP(amplified fragment length polymorphism)<sup>[15,16]</sup>这种高效、可靠、稳定的分子标记<sup>[17]</sup>对分布于三峡库区及其周边地区的8个裸芸香自然居群的遗传多样性进行了检测,旨在进一步了解裸芸香自然居群的遗传变异及遗传结构特征,探讨影响裸芸香遗传结构的因素,推测其致濒原因,为制定有效的保育策略提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

裸芸香的8个自然居群分两次采集,2001年9月中旬至下旬对湖北兴山湘萍、秭归香溪以及重庆巫山和巫溪居群进行采样,2004年3月~5月对湖北兴山高阳、巴东沿渡河、巴东信陵、长阳高家堰进行采样(图1)。在采样同时我们对各居群生境进行了调查(表1)。居群内随机选取15~30个个体,摘取新鲜嫩叶,放入硅胶中快速干燥后置于4℃冰箱中保存待用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA提取

根据改良的CTAB法<sup>[18]</sup>进行基因组总DNA提取。用RnaseA消化除去RNA<sup>[19]</sup>。DNA的质量和浓度以紫外分光核酸测定仪(GENEQUANT, Eppendorf, Germany)测定,并采用0.8%的琼脂糖凝胶检测其质量。

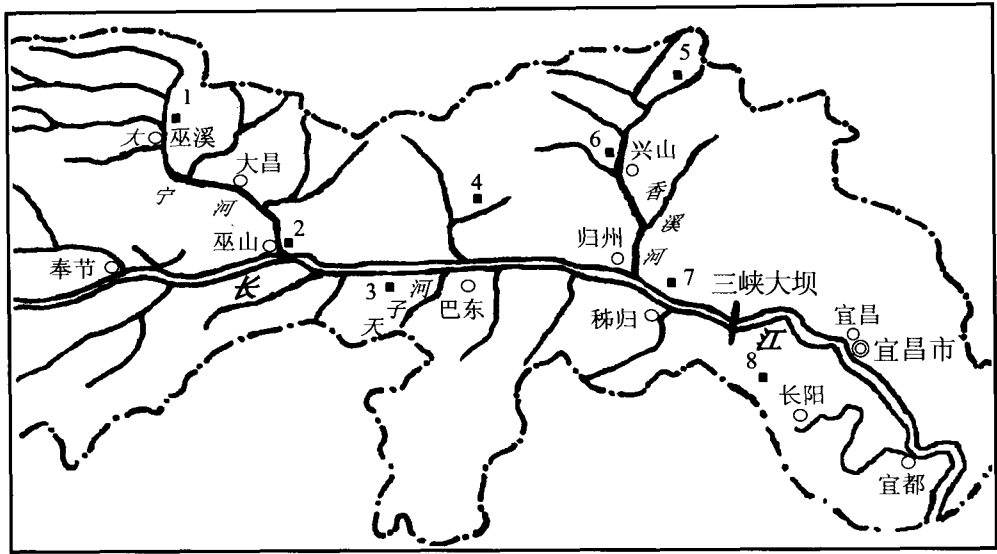
#### 1.2.2 引物筛选

在4个居群中任意选取16个个体的DNA样品用于引物筛选。从上海博雅公司的30对引物中选出5对带型清晰,多态性相对较高的引物(表2)作为正式扩增的引物。

#### 1.2.3 AFLP分析

AFLP分析按照Vos等<sup>[16]</sup>报道的方法稍做修改进行,其基本步骤如下:①取200 ng模板DNA于20 μL酶切消化反应体系[含0.3 EcoR I(10 U/μL), 0.3 μL(10 U/μL) *TruI*和4 μL 5×反应缓冲液]中,先37℃酶切消化3 h,再65℃消化3 h,以1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果,呈弥散状;②DNA片段接头的连接反应体系总体积为25 μL,包括12.5 μL的接头连接反应液(1 μL *EcoR I* Adapter, 1 μL *TurI* Adapter, 0.4 μL T4DNA Ligase)和12.5 μL的酶切DNA,混匀后,于21℃下进行连接反应至少2 h,最好过夜。用0.1×TE缓冲液将连接混合液稀释10倍;③预扩增在总体积为20 μL的反应体系中进行[5 μL连接后稀释的模板DNA, 0.8 μL(50 ng/μL) *EcoR I* + A引物, 0.8 μL

(50 ng/ $\mu$ L) *Mse*I + C 引物, 0.1  $\mu$ L (5 U/ $\mu$ L) *Taq* DNA 聚合酶, 2  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 1.2  $\mu$ L  $MgCl_2$ 。PCR 程序为: 94 $^{\circ}C$  2 min, 94 $^{\circ}C$  30 s, 56 $^{\circ}C$  1 min, 72 $^{\circ}C$  1 min, 共 29 个循环, 72 $^{\circ}C$  5 min 后终止反应, 于 4 $^{\circ}C$  保存。用 0.1  $\times$  TE 缓冲液稀释 25 倍后作为选择性扩增的模板; ④选择性扩增采用



1. 巫溪城厢镇; 2. 巫山双龙镇; 3. 巴东信陵镇; 4. 巴东沿渡河镇; 5. 兴山湘坪; 6. 兴山高阳; 7. 秭归香溪; 8. 长阳高家堰  
1. Chengxiang, Wuxi County; 2. Shuanglong, Wushan County; 3. Xinling, Badong County; 4. Yanduhe, Badong County;  
5. Xiangping, Xingshan County; 6. Gaoyang, Xingshan County; 7. Xiangxi, Zigui County; 8. Gaojiayan, Changyang County

图 1 裸芸香 8 个自然居群的分布

Fig. 1 The distribution of the eight natural population of *Psilopeganum sinense*

表 1 裸芸香采样地点及生境

Table 1 The habitats and localities of the samples of *Psilopeganum sinense*

居群 Population	产地 Locality	海拔(m) Altitude	生境 Habitat	取样数 Sampling size
巫溪(WX) Wuxi	重庆巫溪城厢镇 Chengxiang, Wuxi County, Chongqing	250 ~ 280	山坡及田边; 散生或丛生 Hillside and fields, sparsely and densely grown	22
巫山(WS) Wushan	重庆巫山双龙镇 Shuanglong, Wushan County, Chongqing	110 ~ 150	山坡; 散生或丛生 Hillside, sparsely and densely grown	23
沿渡河(YDH) Yanduhe	湖北巴东县沿渡河镇 Yanduhe, Badong County, Hubei	170 ~ 200	河岸边, 沟边; 丛生或散生 Riverside and grooveside, sparsely and densely grown	22
信陵(XL) Xinling	湖北巴东县信陵镇 Xinling, Badong County, Hubei	200 ~ 220	山坡、路旁; 散生或丛生 Hillside and roadside, sparsely and densely grown	23
湘坪(XP) Xiangping	湖北兴山县湘坪乡 Xiangping, Xingshan County, Hubei	240 ~ 260	山坡、路旁; 散生或丛生 Hillside and roadside, sparsely and densely grown	15
高阳(GY) Gaoyang	湖北兴山县高阳镇 Gaoyang, Xingshan County, Hubei	250	河岸边, 沟边; 丛生或散生 Riverside and grooveside, sparsely and densely grown	30
香溪(XX) Xiangxi	湖北秭归县香溪镇 Xiangxi, Zigui County, Hubei	130	公路旁山坡上; 丛生 Hillside of roadside, sparsely and densely grown	12
高家堰(GJY) Gaojiayan	湖北长阳县高家堰镇 Gaojiayan, Changyang County, Hubei	190 ~ 210	坡底沟边及田边; 散生或丛生 Grooveside and fieldside, sparsely and densely grown	17

表 2 各对引物序列组合、扩增总带数、扩增片段大小、多态带数、多态带百分率

Table 2 Sequence of pairs of primer, total number of loci, length of segments, number of polymorphic loci, proportion of polymorphic loci

引物编号 Code of primer	引物组合 Primer pairs	扩增总带数 Total number of AFLP bands	带长(bp) Length of band	多态带数 Num. of polymorphic bands	多态带百分率(%) Proportion of polymorphic bands
P1	E-AGA/M-CAA	20	70 ~ 400	13	65.0
P2	E-AGA/M-CTA	37	70 ~ 400	10	27.0
P3	E-AAG/M-CAG	33	70 ~ 400	10	33.3
P4	E-AAG/M-CAA	53	70 ~ 400	25	47.2
P5	E-AAG/M-CTA	37	70 ~ 400	18	48.6

10  $\mu\text{L}$  反应体系[2.5  $\mu\text{L}$  经预扩增后稀释的模板 DNA, 2  $\mu\text{L}$  (10 ng/ $\mu\text{L}$ ) 的 *EcoR* I + A 选择性引物, 2  $\mu\text{L}$  的 *Mse* I + C 选择性扩增引物, 0.125  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶]。PCR 程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 1 次循环; 然后每循环 1 次其退火温度降低 0.7 $^{\circ}\text{C}$ , 执行 12 个循环; 在 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  60 s 下执行 22 个循环后, 终止反应, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  保存; ⑤加入 3/4 体积 (7.5  $\mu\text{L}$ ) 的变性剂 (98% 甲酰胺, 0.03 溴酚蓝和二甲苯氰) 于 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶, 1  $\times$  TBE 缓冲液, 65W 恒定功率电泳约 2 h。AFLP 带型以银染法<sup>[20]</sup> 获得。

#### 1.2.4 数据统计与分析

将每对引物在所有样品扩增出的每一条 DNA 谱带作为一个位点, 参照标准 Ladder, 按引物对号-DNA 片段长度记录位点, 样品有带则记为 1, 无带则记为 0, 构建居群二态数据矩阵。采用 AFLP-Surv 1.0 软件<sup>[21]</sup> 及 POPGENE 1.31 软件<sup>[22]</sup> 对其进行处理, 得到以下遗传多样性参数: ①多态带数 *AP* (number of polymorphic loci) 和多态带百分率 *P* (proportion of polymorphic loci); ②Nei 基因多样性指数 *H* (gene diversity); ③Shannon 信息指数 *I* (Shannon's information index); ④应用 Nei<sup>[23]</sup> 基因多度法计算遗传分化度 *Gst* (the coefficient of gene differentiation among populations within species), 其关系式为  $Gst = Dst/H_T$ , 其中  $H_T = H_S + Dst$ ,  $H_T$  为总遗传多样性,  $H_S$

为群体内的遗传多样性, *Dst* 为群体间遗传多样性; ⑤根据公式  $Nm = 0.5(1 - Fst)/Fst$  间接推算居群间基因流, 在此, *Fst* 值等同于 *Gst*; ⑥Nei 的遗传距离 *D* (gene distances)。采用 NTSYS 软件<sup>[24]</sup> 进行居群聚类分析。

采用 AMOVA (analysis of molecular variance) 软件进行分子方差分析, 计算反映群体遗传结构及变化的平方和、均方、方差分量, 求得遗传多样性在地区间、地区内以及居群内的分布。另外, 我们把长江南岸的 2 个居群 (信陵、高家堰) 和北岸的 6 个居群 (沿渡河、高阳、湘坪、巫山、巫溪、香溪) 分为 2 个类群, 进行 AMOVA 分析, 以明确遗传多样性在长江两岸的分化情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 AFLP 遗传多样性

从 30 对引物中筛选出 5 对引物 (表 2) 对裸芸香 8 个自然居群的 164 个样品进行了 AFLP 检测。结果共得到 180 条清晰谱带, 介于 70 ~ 400 bp 之间, 其中 76 个多态位点, 多态位点百分率为 42.2%。不同引物扩增出的位点数不同, 其中引物 P4 扩增出的位点数最多 (53 个), 引物 P1 扩增出的位点数最少 (20 个)。另外, 多态位点在不同居群中的分布也有差异, 8 个自然居群扩增出的多态位点百分率为 3.3% ~ 16.7%, 其中高阳居群最高 (16.7%), 信陵居群次之 (12.8%), 湘坪居群最低 (3.3%) (表 3)。

表 3 裸芸香自然居群的遗传变异  
Table 3 Genetic variation of eight natural populations of *P. sinense*

居群 Population	个体数 Num. of samples	总位点数 Total number of loci	多态位点数 Num. of poly- morphic loci	多态位点 百分率 (%) PPL	Nei's 基因多样性 <i>H</i>	Shannon's 指数 <i>I</i>
重庆巫溪 (WX)	22	180	11	6.1	0.03223	0.0340
标准差 Standard deviation					0.00678	0.1336
重庆巫山 (WS)	23	180	16	8.9	0.03961	0.0483
标准差 Standard deviation					0.00722	0.1497
巴东沿渡河 (YDH)	22	180	16	8.9	0.04956	0.0522
标准差 Standard deviation					0.00854	0.1670
巴东信陵 (XL)	23	180	23	12.8	0.06285	0.0676
标准差 Standard deviation					0.00848	0.1746
兴山湘坪 (XP)	15	180	6	3.3	0.01987	0.0197
标准差 Standard deviation					0.00555	0.1056
兴山高阳 (GY)	30	180	30	16.7	0.06987	0.0816
标准差 Standard deviation					0.00943	0.1930
秭归香溪 (XX)	12	180	18	10.0	0.06133	0.0543
标准差 Standard deviation					0.00809	0.1630
长阳高家堰 (CJY)	17	180	15	8.3	0.04724	0.0506
标准差 Standard deviation					0.00789	0.1584
居群水平 Mean of population	19.2	180	16.9	9.4	0.03420	0.0510
标准差 Standard deviation					0.00775	0.1556
物种水平 Species level	164	180	76	42.2	0.0811	0.1323
标准差 Standard deviation					0.1419	0.2101

Notes: PPL = Proportion of polymorphic loci; *H* = Nei's gene diversity; *I* = Shannon's Information Index.

值得注意的是:居群特有位点较多,为 15 个,占总多态位点的 19.6%,多分布于沿渡河、高阳、长阳居群中,而在巫山和巫溪居群中则没有分布。其中居群内特有单态位点为 4 个,占总多态位点的 5.3%,这可能暗示着裸芸香居群分化存在着特殊规律。

裸芸香的遗传多样性比较低(表3,表4)。表现在:居群平均多态位点百分率为9.4%,其中高阳居群最高(16.7%),湘坪居群最低(3.3%);Nei's基因多样性( $H$ )为0.01987~0.06987,平均为0.03420;Shannon's多态性信息指数( $I$ )为0.0197~0.0816,平均为0.0510。其中高阳居群均为最高( $H=0.06987$ ,  $I=0.0816$ ),湘坪居群均最低( $H=0.01987$ ,  $I=0.0197$ );物种水平上Nei's基因多样性指数为0.0811,Shannon's多态性信息指数为0.1323。

2.2 居群遗传结构

裸芸香遗传结构分析表明,各居群遗传分化较大。8个自然居群总的遗传多样性  $H_t=0.0971$ ,其中居群内保有的遗传多样性( $H_s$ )为0.0478,居群间遗传多样性( $D_{st}$ )为0.0492,基因分化系数  $G_{st}$  为0.5069,表明总遗传多样性的 50.69% 来源于居群间遗传变异,49.31% 来源于居群内遗传变异,也就是说居群间的遗传分化较居群内大。AMOVA 软件分析结果表明,有 13.17% ( $P=0.0695$ ) 的多样性来自地区间,有 50.45% ( $P<0.001$ ) 的多样性来自居群内,有 36.38% ( $P<0.001$ ) 的多样性来自

居群内。在对长江两岸的居群遗传分化分析中,总遗传多样性的 0.73% ( $P=0.3786$ ) 来自群体间,62.5% ( $P<0.001$ ) 来自群体内居群间,37.12% ( $P<0.001$ ) 来自居群内。

裸芸香各居群间基因流根据公式  $Nm=0.25(1-F_{st})/F_{st}=0.2432 (<1)$ ,说明居群间基因流有限,不足以维持各居群间基因交流及现有的居群遗传结构。

2.3 居群遗传距离与 UPGMA 聚类分析

裸芸香自然居群间遗传距离在 0.0189~0.1091 之间,平均遗传距离为 0.0528,其中沿渡河居群与巫山居群遗传距离最大(0.1091),高阳居群与香溪居群遗传距离最小(0.0189),而沿渡河居群与其他居群的遗传距离相对较大(表5)。

聚类结果显示,高家堰、香溪、高阳、信陵 4 个居群优先聚类,并且成为一个主聚类组,反映出它们较近的遗传关系,而巫山、巫溪和湘坪、沿渡河居群与主聚类组明显分离,显示出相对较大的遗传分化。另外,位于长江南岸的高家堰和信陵居群并没有优先聚类(图2)。

2.4 居群遗传距离与地理距离的 Mantel 检测

用 NTSYS 软件对居群遗传距离与地理距离进行 Mantel 检验,以明确遗传距离与地理距离之间的关系。结果表明:裸芸香居群遗传距离与地理距离不存在相关性( $r=-0.19415$ ,  $p=0.1959$ )。

表 4 裸芸香 8 个自然居群基因多样性分析  
Table 4 Genetic diversity analysis of eight natural populations of *P. sinense*

项目 Item	总基因多样性 $H_t$	居群内基因多样性 $H_s$	居群间基因多样性 $D_{st}$	基因分化系数 $G_{st}$	基因流 $Nm$
平均值 Mean	0.0971	0.0478	0.0492	0.5069	0.2432
标准差 Standard deviation		0.005961	0.005350	0.090339	

Notes:  $H_t$  = total gene diversity;  $H_s$  = gene diversity within populations;  $D_{st}$  = gene diversity among populations;  $G_{st}$  = the coefficient of gene differentiation;  $Nm$  = gene flow,  $Nm=0.25(1-G_{st})/G_{st}$ .

表 5 裸芸香 8 个自然居群间的遗传距离  
Table 5 Nei's genetic distance of eight natural populations of *P. sinense*

居群 Population	巫溪(WX)	巫山(WS)	沿渡河(YDH)	信陵(XL)	湘坪(XP)	高阳(GY)	香溪(XX)
巫山(WS)	0.0306						
沿渡河(YDH)	0.0965	0.1091					
信陵(XL)	0.0319	0.0428	0.0669				
湘坪(XP)	0.0528	0.0674	0.0626	0.0611			
高阳(GY)	0.0603	0.0629	0.0561	0.0400	0.0348		
香溪(XX)	0.0632	0.0694	0.0515	0.0305	0.0473	0.0189	
高家堰(GJY)	0.0323	0.0376	0.0750	0.0212	0.0566	0.0509	0.0495

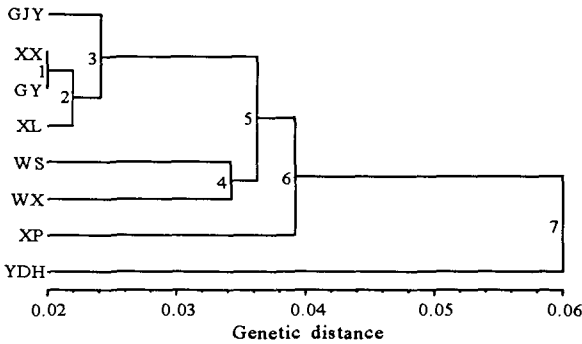


图2 裸芸香8个自然居群的 Nei's 遗传距离UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of UPGMA based on Nei's genetic distance of the eight natural populations of *P. sinense* (Population codes are given in Table 1)

### 3 讨论

#### 3.1 低遗传多样性

本研究结果表明,裸芸香具有较低的遗传多样性( $P=42.2\%$ ,  $H_t=0.0971$ ),低于世界广布种平均水平,略高于特有种平均水平<sup>[25,26]</sup>,并且种群内遗传多样性的平均水平( $P=9.4\%$ ,  $H=0.3420$ )要大大低于物种水平。与其他稀有物种和地方特有种的 AFLP 结果相比,在物种水平上裸芸香的遗传多样性处于中等水平,而从居群水平来看则较低<sup>[27,28]</sup>。物种遗传多样性的高低与很多因素有关,而在遗传多样性形成的过程中,有可能其中一种因素起到了主导作用。无论是在种群数量和大小、生物地理,还是在物种形成上的任何波动都会对现有物种的遗传组成起到至关重要的作用<sup>[25,26]</sup>。Hamrick 和 Godt<sup>[25]</sup>对 449 种植物的 653 例等位酶遗传变异进行了研究,他们综合分析了植物遗传多样性与系统位置、分布范围、分布地区、生活型、繁育系统、种子传播方式、生殖类型和演替阶段 8 个特征的相互关系,发现影响种群遗传变异大小的主要因素依次为:繁育系统、分布范围和生活型,并指出地方特有种或狭域分布的种具有较低的遗传多样性。Karron<sup>[27]</sup>总结了 11 群同属种的对比研究,结果也表明,不管是从多态位点比例还是从平均每个位点等位基因数目上看,特有或稀有种的遗传变异水平都要比其近缘(同属)广布种为低。裸芸香是我国特有单属植物,仅分布于湖北(巴东、兴山、宜昌、秭归),重庆(巫山、巫溪、丰都、南川、武隆)等地,作为一种狭域分布的特有单属多年生草本植物,裸芸香较低的遗传多样性符合以上规律。

造成裸芸香较低遗传多样性的因素是多方面

的。首先,裸芸香分布区域相对狭窄,生境相对单一,多种环境对它的选择作用对其遗传多样性的积累作用微弱;其次,由于自然或人为的因素使得裸芸香受到瓶颈效应(bottleneck effect)的作用。裸芸香在系统进化上的孤立性即单种属的华中特有种,自花受精以及低的遗传多样性水平表明该种正在经历瓶颈效应的过程中。在裸芸香的带型中出现了相当比例的居群特有位点(19.6%)以及居群内特有单态位点(5.3%),也进一步证实了瓶颈效应对裸芸香遗传基础的影响<sup>[29]</sup>。高阳居群的遗传多样性最高( $P=16.7\%$ ,  $H=0.06987$ )可能是由于受到瓶颈效应影响较小,而且当地微生境复杂(其气候垂直差异大,小气候特征明显)的原因。湘潭居群的遗传多样性最低( $P=3.3\%$ ,  $H=0.01987$ )则可能是经历了严重的瓶颈效应,而另一方面也可能与采样量有关<sup>[30]</sup>;再次,自交或近交衰退引起裸芸香居群内遗传多样性降低。裸芸香物种水平的多样性显著高于居群水平的多样性正说明了由于居群较小,传粉媒介传粉能力有限(小型昆虫)而使得种群内个体趋于近交或自交(套袋实验证明,裸芸香可自交结实)。虽然我们对裸芸香的繁育系统并不很了解,但以上条件必然导致近交或自交的频繁发生,从而导致近交或自交衰退。而一般认为近交或自交衰退会降低个体适应性(individual fitness),降低居群的遗传多样性和增长速度<sup>[31-33]</sup>,从而使其居群内呈现很低的遗传多样性。

另外,我们得出的结果与 RAPD 的结果( $P=67.06\%$ ,  $H=0.2082$ )有所差异<sup>[12]</sup>,这有两方面的原因,第一,由于分子标记的不同造成这种差异。一般来讲,AFLP 比 RAPD 能够检测出更多的位点,覆盖了基因组中更多的片段<sup>[34]</sup>,在这样的条件下多态带比例减少属于正常情况;第二,采样地的差异。AFLP 的样品采自湖北、重庆的 8 个自然居群,包括了 RAPD 标记所做的 5 个居群,并且增加了高阳居群以及长江以南的长阳、信陵居群,从空间上看,样本所覆盖的面积对遗传参数估算有相当重要的影响,样本覆盖面积占整个群体面积的比例越大,对遗传参数引起的偏差可能越小<sup>[27]</sup>,因此,采样地的覆盖范围以及样本量的增大使得实验结果更加接近裸芸香的真实遗传多样性水平。

#### 3.2 居群分化与基因流

以往的研究<sup>[35]</sup>已经表明了影响植物种群遗传结构的主要因素依次为:繁育系统、分布范围和生活型。另外,种子扩散机制也显示了类群间居群分化

系数上的很大差异,靠风力散布的植物具有低水平的居群分化( $G_{st} = 0.143$ ),而靠重力散布的植物具有相当强的居群分化水平( $G_{st} = 0.277$ ),一般认为,自交、短命草本植物具有相对较大的居群分化<sup>[25,36]</sup>。裸芸香的居群分化系数很大( $G_{st} = 0.5096$ ),其遗传多样性 50.96% 分布在居群间,49.04% 分布在居群内。AMOVA 软件分析结果也表明遗传多样性主要分布于地区间(13.17%)和居群间(50.45%)。这一结果与 RAPD 的结果( $G_{st} = 0.5391$ )基本相同。

我们推断造成裸芸香居群间遗传分化大的原因主要有三个:①自交或者近交在裸芸香的交配系统中占有相当比例。裸芸香的居群分化系数( $G_{st} = 0.5096$ )与自交种的居群分化系数( $G_{st} = 0.51$ )相近<sup>[25]</sup>。交配系统一直被视为影响植物种群遗传结构的一个重要因素<sup>[25]</sup>。它控制着基因由配子体在两个世代间的传递与延续,对植物种群遗传结构有着重要的作用。由于裸芸香为小型昆虫传粉,传粉能力受到很大限制,而种子多通过重力或水流传播,传播距离也极为有限,这样就迫使裸芸香进行自交或近交,从而使得居群内遗传多样性降低并趋同,进而居群间遗传分化增大;②种子的传播方式。裸芸香的果实为蒴果,顶部呈口状凹陷,果实成熟时开裂,种子长约 1.5 mm,厚约 1 mm,表面无翅、无刺,仅具有疣状突起<sup>[5]</sup>,具有重力传播的特征。此外,野外调查发现裸芸香的分布地点大多为水流沿岸的斜坡地带,也就是说裸芸香的分布与水流有一定的相关性,因此,我们推测裸芸香的种子还有可能靠水流传播。而这两种传播途径都具有很大的局限性,使得裸芸香居群间基因交流受到很大的限制,从而增大居群间遗传分化;③生境片段化的结果。由于“随机取样”效应的作用,生境片段化将会增大居群间的遗传分化<sup>[29]</sup>,而交配系统,种子传播的受限则使得生境片段化在形成遗传结构的过程中继续起作用。另外,Mantel 检验的结果也很好解释了“随机取样”(random sampling)作用,使裸芸香并没有按照地理距离的远近分布。

裸芸香居群间基因流为 0.2432 ( $< 1$ ),这就意味着居群间基因流不足以防止居群间的遗传分化。Wright (1951)<sup>[37]</sup>指出:如果  $Nm$  小于 1,则由于遗传漂变可导致小居群间明显分化,而遗传漂变作用加剧,遗传变异减少,会导致居群适合度下降。由此可见,裸芸香居群间基因流过小是小居群分化

的主要原因<sup>[38]</sup>。

为了更加清楚的认识裸芸香的遗传基础,对于裸芸香的进化历史、繁育系统、演替阶段等方面还需要更深入的了解。

### 3.3 居群聚类分析与 Mental 检验

从居群聚类图分析,巴东居群与其他居群遗传距离较远,自成一支,其余居群中香溪、高阳、信陵、高家堰 4 个居群最先聚类,巫山、巫溪聚类后与这 4 个居群聚类,最后与湘坪居群聚类。位于长江南岸的 2 个居群并没有与长江北岸的居群产生明显分化,在 AMOVA 分析中也得到了同样的结果(南北两岸分化仅占总遗传多样性的 0.73%)。这说明一方面生境片段化的时间不长,随机取样作用在居群结构的形成上仍然起作用;另一方面也可能说明长江并没有成为裸芸香扩散的障碍,这与我们的种子扩散机制比较吻合,也就是说,水流可以作为裸芸香种子扩散的一种媒介。在实地调查中,我们发现,一般裸芸香有分布的地方(多为水流旁边)在水流两岸均有分布,而且从其种子形态大小来看也可适应水流传播。

居群遗传距离与地理距离的 Mental 检验表明,两者不相关( $r = -0.19415$ ,  $p = 0.1959$ ),这主要是由于生境片段化的“随机取样”效应所致。另外,由于裸芸香多分布于低海拔地区,人为因素(如开荒种田和水利工程)对其影响较大,生境片段化是造成这种不相关性的重要原因。这个结果同时也说明了居群间基因交流十分有限<sup>[29]</sup>,使得居群间遗传差异很难通过有效基因流来弥补。而此结果与 RAPD 的结果(显著相关,  $r = 0.93094$ ,  $p = 0.9861$ )有差异,但是从聚类图来看, AFLP 聚类图所包括的 RAPD 的 5 个居群聚类情况基本一致(巴东居群与其他居群遗传距离较远,巫山和巫溪聚在一起)。也就是说,包含更多的居群更能说明遗传距离与地理距离的真实关系。

另外,值得注意的是,居群间的遗传分化较大而居群间的遗传距离则相对较小,这也许是从另一个侧面反映了较低的遗传基础。居群间遗传分化反映了多态位点的分化程度,居群间遗传距离则反映了在所有位点基础上的各居群的遗传关系。也就是说居群间较小的遗传距离反映了整个物种较低的遗传基础,而较大的遗传分化则反映了居群间有限的基因交流。

### 3.4 濒危原因及保育策略

#### 3.4.1 濒危原因探讨

关于物种濒危的机制一直是遗传学家和生态学家争论的焦点,遗传学家偏重遗传基础,而生态学家则强调生态环境的作用<sup>[26]</sup>。而一个物种的濒危往往是两方面因素共同作用的结果。裸芸香的濒危就是内外因共同作用的结果。一方面,自交衰退、瓶颈效应和缺乏自然选择作用导致裸芸香的低遗传多样性是造成其濒危的内在因素。根据自然选择的基本原理,居群的进化速率与其遗传多样性成正比,换句话说,一个群体中遗传多样性的下降意味着其适应环境变化能力的下降<sup>[25,39]</sup>。裸芸香的低遗传多样性决定了其很难适应变化的环境,又由于人类活动的影响,裸芸香的生境正在遭受严重的破坏,这就使得裸芸香遗传基础薄弱的特点更加凸显出来,结果造成其资源的不断减少以致濒危。

另一方面,人为因素造成的适宜生境的不断缩小是裸芸香濒危的外在因素。裸芸香的生存环境在低海拔的河岸边、溪沟边,容易受到人类生产活动和水利工程的影响。裸芸香大多分布于三峡库区及其周边地区,三峡工程的实施必然对其生境造成极大的毁坏,使其生境进一步片断化。另外,由于裸芸香是一种重要的药用植物,人为采集对其资源形成了很大的威胁,人为的开荒种田等活动也使其生境进一步缩小,对裸芸香资源造成很大的威胁,丰都居群的灭绝主要就是由于人类活动(如开荒种田等)造成的。丰都居群以及香溪、巫山居群的灭绝为我们敲响了警钟,必须尽快实施有效措施保护裸芸香资源。

#### 3.4.2 保育策略

裸芸香种质资源的有效保育对该物种的保存、群落和生态系统的维持有着重要意义<sup>[40]</sup>,裸芸香作为我国特有的单种属珍稀植物,其资源正在遭受着不断减少的威胁,制定和实施有效的保育措施迫在眉睫。通过对裸芸香遗传基础的了解,我们提出如下保育策略:裸芸香居群间分化较大,遗传多样性主要分布在居群间,任何一个居群的丧失都会造成其遗传多样性的损失,并降低其适应潜力,因而我们应该保护尽可能多的种群,高阳居群遗传多样性最高,沿渡河居群、高阳居群、长阳居群具有居群特有位点,应该对其进行重点保护<sup>[26,41]</sup>。种群内遗传多样性很低是裸芸香遗传结构的又一特点,为了丰富种群内的遗传多样性,我们应该人为加强其种群间基因交流,可以在种群间进行个体迁移。由于裸芸

香有相当一部分资源位于三峡库区,三峡工程的实施将对其造成严重影响,对于受到三峡大坝影响的地区只能进行迁地保护,在迁地保护过程中应进行混合繁殖。中科院武汉植物园早在1995年就开展了裸芸香的迁地保护工作,但是由于其对异地生境的适应能力较差,并不算成功<sup>[12]</sup>。2004年3~5月间又分别对长阳高家堰、巴东沿渡河、兴山高阳居群共约150株个体进行了迁地保护,迁移过程中我们发现裸芸香对积水反应敏感,裸芸香根系发达,多生于坡地,我们推测其虽然多分布于沿河岸地带,但一般为坡地,说明其可能喜干旱环境,另外在夏季有易倒伏的特点。基于以上各点,我们认为裸芸香的迁地保护地宜选择与其原始生境相似的坡地灌丛中。我们在黄陂寿山寺的3棵迁地保护植株长势良好,能够很好的完成其生活史,而所选择的生境就是与裸芸香原始生境很相近的坡地灌丛中,这也证明了我们提出的生境地是合理的。

对于未受到三峡工程影响的地区,就地保护是最佳选择。而在就地保护过程中应该对不同种群间进行个体迁移,以提高种群的遗传多样性进而提高其适应潜力。另外,对于这些地区防止其生境的进一步破坏以及人类的采集活动是极为重要的。这就需要向当地居民宣传保护这一珍贵资源的重要性,提高当地居民的保护意识。

#### 参考文献:

- [1] Haig S M. Molecular contributions to conservation[J]. *Ecology*, 1998, 79(2): 413-425.
- [2] Rosseto M H, Harriess F C L, Mclauchlan A. Interspecific amplification of tea tree (*Melaleuca alternifolia*-Myrtaceae) microsatellite loci-potential implication for conservation studies[J]. *Aust J Bio*, 2000, 48: 367-373.
- [3] 王峥嵘, 彭少麟. 植物保护遗传学[J]. *生态学报*, 2003, 23(1): 158-172.
- [4] 郑重. 湖北的珍贵稀有植物[J]. *武汉植物学研究*, 1986, 4(3): 279-296.
- [5] 黄成就. 中国植物志(第43卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 89-91.
- [6] Lande R. Genetics and demography in biological conservation[J]. *Science*, 1988, 241: 1455-1460.
- [7] Leberg P L. Genetic consideration in the design of introduction programs[J]. *Transactions of the North American Wildlife and Natural Resource Conference*, 1990, 55: 609-619.
- [8] Hamrick J L, Godt H J W, Murawski D A, et al. Correlation between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology[A]. In: Falk D A, Holsinger K E eds. *Genetics and Conservation of Rare plants*[C]. New York USA: Oxford University Press, 1991. 76-86.
- [9] 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性



- 保护[J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 92-96.
- [10] 袁萍, 张银华, 王国亮, 南蓬, 龚复俊. 中国珍稀植物裸芸香化学成分研究[J]. 武汉植物学研究, 1999, 17(2): 184-186.
- [11] 叶其刚, 徐惠珠, 王诗云. 裸芸香的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1995, 1: 43-44.
- [12] 宋卫华, 李晓东, 李新伟, 黄宏文, 李建强. 三峡库区稀有植物裸芸香的遗传多样性和保育策略[J]. 生物多样性, 2004, 12(2): 227-236.
- [13] Taylor B L, Dizon A E. The need to estimate power to link genetics and demography for conservation[J]. *Conserv Biol*, 1996, 10: 661-664.
- [14] Tallmon D A, Draheim H M, Mills L S, Allendorf F W. Insights into recently fragmented vole populations from combined genetic and demographic data[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 699-709.
- [15] O'Brien S J. A role for molecular genetics in biological conservation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5784-5755.
- [16] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De, Lee T, Hornes M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acid Res*, 1995, 23: 4407-4414.
- [17] Powell W, Morgante M, Mndre C. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. *Mol Breed*, 1996, 2: 225-238.
- [18] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissues[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 9(1): 11-15.
- [19] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Sruhl K. Current Protocols in Molecular Biology[M], New York: Wiley, 1987.
- [20] Challoub B A, Thibault S, Laucou B. Sliver staining and recovery of AFLP(TM) amplification products on large denaturing polyacrylamide gels[J]. *Biotechniques*, 1997, 22: 216-218.
- [21] Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 139-151.
- [22] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits[J]. *Belgian J Bot*, 1997, 129: 157.
- [23] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973 (12): 3321-3323.
- [24] Rohlf F J. NTSYS-PC. Version 2.10. New York: Applied Bio-statistics Inc, 1994.
- [25] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [A]. In: Brown A D H, Clegg M T, Kahler A L eds. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources [C]. Sinauer: Sunderland, 1989. 43-63.
- [26] Hamrick J L, Godt M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species[J]. *Philosophical Transactions of London Biological Sciences*, 1996, 351: 1291-1298.
- [27] Karin Tremetsberger, Stuessy Tod F. Guo Y P, Baeza Carlos M, Hanna Weiss, Samuel Rosabelle M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern[J]. *South America*, 2003, 5: 237-245.
- [28] 李昂, 葛颂. 不同采样策略对距距堇菜遗传多样性估算的影响[J]. 植物学报, 2000, 42(10): 1069-1074.
- [29] Urs Landergott, Rolf Holderegger, Gregor Kozlowski, Schneller Jakob J. Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata* [J]. *Heredity*, 2001, 87: 344-355.
- [30] 李昂, 葛颂. 植物保护遗传学研究进展[J]. 生物多样性, 2002, 10(1): 61-71.
- [31] Dobson A P, Mace G M, Poole J, Brett R A. Conservation biology: The ecology and genetics of endangered species [A]. In: Genes in Ecology [C]. Oxford: Blackwell, 1992: 405-430.
- [32] Oostermeijer J G B. Population viability analysis of the rare *Gentiana pneumonanthe*: the importance of genetics, demography and reproductive biology [A]. In: Young A G, Clarke G M eds. Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations [C]. U K: Cambridge, 2000: 313-334.
- [33] Brook B W, Tonkyn D W, O'Grady J J, Frankham R. Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species [J]. *Conservation Ecology*, 2002, 6: 16.
- [34] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [35] Loveless M D, Hamrick J L. Ecological determinants of genetic structure in plant population [J]. *Ann Rev Ecology Systematics*, 1984, 15: 65.
- [36] Bartish I V, Jeppsson N, Nybow H. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers [J]. *Molecular ecology*, 1999, 8: 791-802.
- [37] Wright S. The genetical structure of population [J]. *Ann Eugen*, 1951, 15: 323-354.
- [38] 邱英雄, 黄爱军, 傅承新. 明党参的遗传多样性研究 [J]. 植物分类学报, 2000, 38(2): 111-120.
- [39] Lande R, Shannon S. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment [J]. *Evolution*, 1996, 50: 434-437.
- [40] Huang H W, Han X G, Kang L, Raven P, Jackson P, Jackson P W, Chen Y Y. Conservation native plants in China [J]. *Science*, 2002, 297: 935-936.
- [41] Hogbin P M, Peakall R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata* [J]. *Conservation Biology*, 1999, 13: 514-522.