

内蒙古中东部不同草原地带羊草种群遗传分化

刘惠芬^{1, 2}, 高玉葆^{1*}, 阮维斌¹, 陈磊¹, 李长林¹, 赵念席¹, 王丹¹

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 天津农学院, 天津 300384)

摘要:运用 RAPD 技术对内蒙古不同草原地带分布的 5 个羊草种群(共 100 个个体)的遗传多样性进行分析。31 个随机引物(10nt)在 5 个羊草种群中共检测到 496 个扩增片断,其中多态性片断 489 个,总的多态位点百分率达 98.6%。利用 Nei 指数和 Shannon 指数估算了 5 个种群的遗传多样性,并计算种群相似系数和遗传距离运用 UPGMA 法进行聚类分析。结果表明:无论是种群内还是种群间,羊草均存在较高的遗传变异,大部分的遗传变异存在于种群内(Nei 指数和 Shannon 指数估算结果分别为 85.4%和 72.5%),只有少部分的遗传变异存在于种群间;不同种群的遗传多样性存在差异,各种群的遗传多样性与其所处的地理位置具有显著的相关性;5 个种群的平均遗传距离为 0.5095,变异范围为 0.4684~0.5476;聚类分析结果显示地理距离较近的种群遗传距离较小,首先聚在一起,而地理距离较远的种群遗传距离较大,说明羊草种群间的遗传分化与地理距离存在一定相关性;但地理距离最近的两个种群并未最先聚集,说明羊草种群间的分化还与其生境的异质性有关。

关键词:羊草;RAPD;地理种群;遗传分化

Genetic differentiation within and between *Leymus chinensis* populations from different zones of Mid-Eastern Inner Mongolia steppe

LIU Hui-Fen^{1,2}, GAO Yu-Bao^{1*}, RUAN Wei-Bin¹, CHEN Lei¹, LI Chang-Lin¹, ZHAO Nian-Xi¹, WANG Dan¹ (1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(10): 2157~2164.

Abstract: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was applied to five populations (100 individuals altogether) of *Leymus chinensis* from different steppe zones of Inner Mongolia. The number of DNA bands amplified per primer was 15.7 on average. The number of DNA bands amplified per plant among the five populations decreased with the increase of longitude, and there existed a negative correlation between the number of bands per plant and the longitude. A total of 496 amplified fragments were detected using 31 random primers, among which 489 loci (98.6%) were polymorphic. The genetic diversity of *Leymus chinensis* was relatively high and the genetic variation existed mainly within the populations (Nei Index and Shannon Index were 85.4% and 72.5% respectively). High intraspecific genetic diversity of *Leymus chinensis* was the genetic basis for its adaptive ability to various environments, its wide distribution and high tolerance. The genetic diversity level among the five populations varied with their geographic locations that differed in environmental factors such as humidity and temperature. Natural selection pressure might have had an effect on the level of genetic diversity. In terms of proportion of polymorphic loci and genetic diversity of the populations, Keshiketeng population had the highest genetic diversity, followed by Abaga population, and Huolinguole population had the lowest genetic diversity. A strong flow occurred among the populations, with the number of migrants per generation (N_m) being 1.622, which might have prevented *Leymus chinensis* populations from differentiation due to genetic drift. Similarity and genetic distance matrices were established from the RAPD data on the basis of Nei's estimation methods, and dendrograms were constructed based on UPGMA clustering. The average genetic distance

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G2000018601)

收稿日期:2003-12-12; **修订日期:**2004-07-05

作者简介:刘惠芬(1967~),女,河北人,博士,副教授,主要从事植物生理生态及生态遗传学研究。E-mail:liuhuifen@eyou.com

*** 通讯作者** Author for correspondence. E-mail: ybgao@nankai.edu.cn

Foundation item: National Key Basic Research Special Foundation Project (No. G2000018601)

Received date: 2003-12-12; **Accepted date:** 2004-07-05

Biography: 刘惠芬,女,1967年生,博士,副教授,主要从事植物生理生态及生态遗传学研究。E-mail:liuhuifen@eyou.com

among the five populations was 0.5095, varying from 0.4684 to 0.5476, which indicated that there were relatively high genetic variations and differentiations among the five populations in the study area. There was a significantly positive correlation between genetic differentiation and geographic distance among *Leymus chinensis* populations. The populations from farther locations were clustered into a group lastly, while the populations with shortest geographic distance were not aggregated in the first group. These results implied that the level of genetic differentiation of *Leymus chinensis* was related in a large scale to environment gradient, but was affected in a smaller scale by more ecological factors of its habitat.

Key words: *Leymus chinensis*; RAPD; geographic populations; genetic differentiation

文章编号:1000-0933(2004)10-2157-08 中图分类号:Q346,Q948 文献标识码:A

变异是生物进化的基础,遗传分化在种群内或种群间都会发生,而且在不同尺度范围即不同空间均会发生。近年来,国内外学者利用 RAPD 技术对多种植物进行了种内变异、种间变异及遗传分化的研究^[1~6]。羊草(*Leymus chinensis*)是内蒙古东部草原地带不同类型草原的建群种或优势种。在不同的土壤、水分、温度等生态因子作用下,在长期的适应和进化过程中,不同地理种群羊草在形态结构、生理生化反应、同工酶直到 DNA 水平上均产生了不同程度的分化^[7~10]。目前,对羊草遗传分化的研究多集中在大尺度范围的种群或不同生态型之间^[11~14],有关同一生境的连续分布种群或相邻群落地段的种群遗传分化也有报道^[14]。对地理距离较小、但生境存在间隔情况下羊草的种群遗传分化也有报道^[15]。对于内蒙古不同草原地带羊草遗传多样性及与环境因子的关系却少见报道。本文选用内蒙古不同草原地带分布的 5 个自然羊草种群为材料,利用 RAPD 技术,并结合植物群落分析及土壤样品分析,从 DNA 水平上分析不同地理种群羊草的遗传结构及遗传分化程度,分析遗传标记和环境因子的相关性,并试从理论上探讨遗传变异的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2002 年 7~9 月对内蒙古境内不同草原地带羊草的几个主要分布区进行考察,选取代表性种群 5 个,每个种群随机取样 20 株(羊草植株之间间隔 10m 以上),单株采集叶片硅胶保存^[5],带回实验室于室温保存,并将样地内采集的土壤样品进行分析。5 个地理种群所在生境的自然概况列于表 1。

表 1 5 个羊草种群所在生境的自然概况

Table 1 The environmental data for the five populations of *Leymus chinensis*

种群编号 Population code	样点 Sampling site	纬度(°N) Latitude	经度(°E) Longitude	海拔(m) Altitude	土壤类型 Soil type	群落类型 Community type
P1	霍林郭勒市	45.4	119.7	1015	黑钙土	贝加尔针茅+羊草 ^①
P2	西乌珠穆沁旗	44.5	117.4	1156	暗栗钙土	大针茅+羊草 ^②
P3	阿巴嘎旗	44.0	115.0	1206	砂质栗钙土	羊草+杂类草 ^③
P4	定位站*	43.5	116.6	1323	典型栗钙土	大针茅+羊草 ^②
P5	克什克腾旗	43.5	116.7	1370	暗栗钙土	大针茅+羊草 ^②

* 中国科学院内蒙古草原生态系统定位研究站;① *Stipa baicalensis* + *Leymus chinensis*; ② *Stipa grandis* + *Leymus chinensis*; ③ *Leymus chinensis* + herbs

1.2 DNA 提取与检测

参照 Clark^[16]SDS 法,从硅胶干燥过的羊草叶片中提取 DNA,共获得 DNA 样品 100 份。加入 RNAase 纯化 DNA;在含有 0.5% EB 的 0.8%琼脂糖凝胶中电泳检测各模板有无降解;紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,−20℃保存备用。

1.3 引物筛选

本研究所用引物购自美国 Operon 公司,从 100 个 10 碱基寡聚核苷酸随机引物中经预试验筛选出对全部 DNA 样品均有清晰、稳定扩增产物并且重复性好的 31 条引物,用于扩增反应(表 3)。

1.4 PCR 反应

本试验反应体系为 25μl 的随机扩增反应体系,其中包

表 2 31 个引物对 5 个种群羊草扩增 RAPD 位点数和多态位点比率

Table 2 Number of RAPD loci and proportion of polymorphic loci detected with 31 primers for five populations of *Leymus chinensis*

种群编号 Population code	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci(P)	位点/引物 Number of loci/primer
P1	288	232	80.6	9.3
P2	315	258	81.9	10.2
P3	419	366	87.4	13.5
P4	354	304	85.9	11.4
P5	436	391	89.7	14.1
总计 Total	496	489	98.6	15.7

括: 10×Buffer 2.5μl, MgCl₂(25 mmol/L) 2μl, dNTP (10 mmol/L) 0.5μl, Taq DNA Polymerase (5U/μl) 0.2μl (以上均为 Sangon Ltd. 产品), Primer (5pmol/L) 1μl (Operon 公司), 双蒸水 17.8μl, 羊草基因组 DNA 100ng 左右, 在 Gene 公司的 PTC-100 PCR 仪上进行 RAPD。扩增程序为: 94℃ 预变性 4min; 94℃ 变性 40s, 36℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。

1.5 电泳结果记录

扩增产物用 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳(含 1μg/ml EB)进行分离, 电泳缓冲液为 1×TAE, 以鼎国生物生产的 SD005 为分子量标准, 电泳结果在紫外透射仪上观察拍照。对电泳中能稳定清晰出现的扩增片断(条带)记为 1, 没有扩增产物的记为 0; 与空白对照反应产物具有相同迁移率的带作为污染带, 不予记录。

1.6 数据分析

(1)多态位点比率 分别计算各种群不同位点上的扩增频率, 当某一位点上扩增的 DNA 片断出现频率小于 0.99 时, 该位点为多态位点^[17]。多态位点比率 $P = \text{多态位点数} / \text{检测到的总位点数}$ 。

(2)估算 Shannon 指数^[18]

Shannon 多样性指数
$$H = - \sum P_i \log P_i$$

式中, P_i 为一条扩增产物存在频率。

H 可以计算两种水平的多样性: 种群内遗传多样性 H_{pop} 和种内多样性 H_{sp} 。 H_{pop}/H_{sp} 是种群内遗传多样性所占的比例; $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ 为种群间多样性所占比例。

(3)用 Nei 指数^[19]估算种群遗传结构参数

总基因多样性
$$H_T = 1 - \sum (\sum P_i/n_1)^2/n_2$$

种群内基因多样性
$$H_S = 1 - \sum (\sum P_i^2/n_1)/n_2$$

式中, P_i 为单个位点扩增频率, n_1 为总位点数, n_2 为材料数。

种群间基因多样性
$$D_{ST} = H_T - H_S$$

基因分化系数
$$G_{ST} = D_{ST}/H_T$$

种群每代迁移数目
$$N_m = (1 - G_{ST})/4G_{ST}$$

(4)相似系数、遗传距离和聚类分析 根据 Nei 和 Li^[19]的公式, RAPD 片断的平均遗传相似度

$$F = 2N_{xy}/(N_x + N_y), N_{xy}$$

式中, 为 x 、 y 两个个体共有的扩增带数, N_x 、 N_y 为 x 、 y 两个个体各自拥有的扩增带数。

遗传距离
$$D = 1 - F$$

通过 NTSYS-PC 2.01^[20]程序软件将数据输入计算机, 用 UPGMA 法对 5 个样地羊草种群的 RAPD 结果进行聚类, 构建分子聚类图。

2 结果分析

2.1 RAPD 扩增带的多态性

用 31 个寡聚核苷酸引物对 5 个种群 100 个个体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 共得到 496 个 RAPD 位点(条带), 扩增 DNA 片断长度介于 300~2500bp 之间, 其中多态位点 489 个, 总的多态位点百分率为 98.6%。所用引物在 5 个不同种群所检测出的 RAPD 位点数及多态位点百分率不同(表 2)。克什克腾羊草种群和阿巴嘎羊草种群由这 31 个引物扩增的 RAPD 位点数最多, 分别为 436 和 419; 位点数最少的为霍林郭勒羊草种群和西乌羊草种群, 分别为 288 和 315。多态位点百分率以克什克腾羊草种群为最高(89.7%), 其次为阿巴嘎羊草种群(87.4%), 其它几个羊草种群的多态位点百分率均较高, 均在 80% 以上。高的多态位点比率表明 5 个羊草种群内均存在较高的 RAPD 变异和分化。

各引物检测到的 RAPD 位点数在 5~20 之间, 平均每个引物可检测出 15.7 个位点, 不同引物扩增的多态带数及多态位点比率存在着明显不同。每个个体平均 RAPD 条带数为 6.28 条, 变化范围为 4.3~8.0 条。阿巴嘎羊草种群每个个体平均 RAPD 条带数最多(7.19), 霍林郭勒羊草种群每个个体 RAPD 条带数最少(5.46), 5 个种群每个个体 RAPD 条带数呈现出随经度的增加而递减的趋势。经相关检验表明: 5 个种群的个体平均条带数与各种群所处的经度呈显著负相关($p < 0.05$)。

2.2 不同羊草种群的遗传结构

2.2.1 Shannon 多样性指数 用 31 个引物所检测到的 5 个羊草种群表型频率计算各种群遗传多样性指数(表略)。不同引物检测到的羊草种群内遗传多样性有较大差异, 变化范围 0.000~8.077。5 个羊草种群中, 克什克腾羊草种群的平均遗传多样性最高(4.537), 阿巴嘎羊草种群(4.339), 而霍林郭勒羊草种群的多样性最低(2.622), 多样性排列顺序如下: $P_5 > P_3 > P_4 > P_2 > P_1$ 。遗传多样性的变异范围为 2.622~4.537, 可见羊草不同种群间的遗传多样性存在较大差异。

利用 Shannon 信息指数可把羊草的遗传变异划分为种群内变异和种群间变异(表 3)。由表 3 可以看到,羊草种群内平均遗传多样性为 3.662,种内平均遗传多样性为 5.049。引物 OPQ17 所检测到的种内总的遗传变异最大(6.109),而 OPN09 检测到的遗传变异最小(2.292)。总的来看,羊草的大部分遗传变异(72.5%)存在于种群内,只有 27.5%的遗传变异存在于种群间,即羊草群体间的遗传分化达到 27.5%。不同引物所估算的遗传变异在羊草种群内和种群间的分布存在着差异,引物 OPQ07 检测到种群内遗传变异最大(88.9%),而引物 OPA02 检测到种群内最小的遗传变异(44.2%)。

2.2.2 Nei 基因多样性指数 由 Nei 指数估算各引物检测到的 5 个羊草种群的基因多样性(表 4)与由 Shannon 多样性指数估算的数值相差很大,但所反映的规律基本相同,仍以克什克腾羊草种群遗传多样性最高(0.632),霍林郭勒羊草种群最低(0.501),按基因多样性大小顺序排列如下: $P_5>P_3>P_4>P_2>P_1$ 。根据 Nei 指数计算的 5 个种群间的遗传分化系数为 0.146,即在羊草的总变异中,种群间分子变异占有种群总基因多样性的 14.6%,而 85.4%的变异存在于种群内。

表 3 由 Shannon 信息指数估算的羊草种群内和种群间的遗传分化

Table 3 Partitioning of the genetic diversity between and within populations of *Leymus chinensis* with 31 primers estimated by Shannon's diversity index

引物 Primer	<i>Hpop</i> ^①	<i>Hsp</i> ^②	<i>Hpop/Hsp</i> ^③	$(Hsp-Hpop)/Hsp$ ^④	引物 Primer	<i>Hpop</i> ^①	<i>Hsp</i> ^②	<i>Hpop/Hsp</i> ^③	$(Hsp-Hpop)/Hsp$ ^④
OPA01	2.804	4.971	0.564	0.436	OPQ12	3.570	4.993	0.715	0.285
OPA02	2.123	4.802	0.442	0.558	OPQ14	4.655	6.051	0.769	0.231
OPA03	1.767	2.880	0.613	0.387	OPQ16	2.489	3.360	0.741	0.259
OPA07	4.526	5.936	0.762	0.238	OPQ17	4.241	6.109	0.694	0.306
OPA08	2.104	3.110	0.676	0.324	OPN03	4.343	5.922	0.733	0.267
OPA09	3.422	4.645	0.737	0.263	OPN05	5.053	6.028	0.838	0.162
OPA10	3.824	5.720	0.668	0.332	OPN08	4.288	5.992	0.716	0.284
OPA13	3.327	4.654	0.715	0.285	OPN09	1.583	2.292	0.690	0.310
OPA18	3.759	5.393	0.697	0.303	OPN11	3.781	4.705	0.804	0.196
OPA19	4.781	5.930	0.806	0.194	OPN12	3.696	5.279	0.700	0.300
OPA20	3.798	5.261	0.722	0.278	OPN13	3.371	4.568	0.738	0.262
OPQ03	3.851	4.979	0.773	0.227	OPN14	4.236	5.799	0.730	0.270
OPQ05	4.487	5.387	0.833	0.167	OPN15	3.403	5.269	0.646	0.354
OPQ06	2.744	3.787	0.724	0.276	OPN16	3.845	5.826	0.660	0.340
OPQ07	5.308	5.972	0.889	0.111	OPN20	4.470	5.797	0.771	0.229
OPQ09	3.869	5.113	0.757	0.243	平均 Mean	3.662	5.049	0.725	0.275

① *Hpop* 种群内遗传多样性 Within-population genetic diversity; ② *Hsp* 总的遗传多样性 Total genetic diversity; ③ *Hpop/Hsp* 种群内多样性占总遗传多样的比例 Within-population diversity as a proportion of total genetic diversity; ④ $(Hsp-Hpop)/Hsp$ 种群间遗传多样性比例 Between-population diversity as a proportion of total genetic diversity

2.2.3 基因流 种群每代迁移数 N_m 是测定基因流的一种方法,根据种群间遗传分化系数 G_{ST} 计算不同引物检测到的 N_m (见表 4)。可见,多数引物估算的 N_m 大于 1,其最大值为 4.504,最小值为 0.786,平均值为 1.622。所以可以认为种群之间的基因流很大。这与 Shannon 指数和 Nei 指数得到的大部分遗传变异存在于种群内的结论相一致。

2.3 遗传相似系数、遗传距离及其聚类分析

种群间的 RAPD 片断共享度(即遗传相似度)能够在一定程度上反映种群间的遗传分化和 DNA 差异。将每个引物在 5 个羊草种群上的扩增结果输入计算机,计算得到 5 个种群间的遗传距离和相似系数矩阵(表 5)。结果可见:5 个羊草种群间遗传距离从 0.4684 到 0.5476 不等,平均遗传距离为 0.5095。遗传距离最大的是西乌种群和定位站种群,最小的为定位站种群和阿巴嘎种群。

根据遗传距离用 UPGMA 法进行聚类分析,结果如图 1。本研究中定位站羊草种群和阿巴嘎种群遗传距离最小(0.4684)首先聚集,再与克什克腾羊草种群聚集(遗传距离为 0.5120)为一类;而西乌羊草种群与霍林郭勒羊草种群聚为第二类(遗传距离为 0.4818),最后与前一类在遗传距离 0.5317 处聚集。

3 讨论

3.1 羊草的遗传多样性

由 RAPD 分析得到的数据结果来看,各个地理种群羊草均存在较高的遗传变异,总的多态位点比率为 98.6%,与崔继哲等^[14]的结果(96.1%)较为一致,高于钱吉等^[11]对不同种群羊草的 RAPD 分析(71.9%)及胡宝忠等^[18]对松嫩草原灰绿型和黄

绿型羊草 7 个种群的分析(83.0%),这与钱吉等^[11]、胡宝忠等^[13]分析的是种群间的遗传变异有关。一般来说,代表供实验种群的样本越多,其所覆盖的遗传多态信息越多。另外,崔继哲等^[21]对微生境下羊草两种生态型的等位酶研究中得到的多态位点比率为 78.6%,小于本文的 98.6%。据估计,建立在同工酶电泳可以检测出基础上的遗传变异大概相当于实际值的 1/3~1/2,由于 RAPD 技术是基于 DNA 分子水平,能够检测出更高的突变比率,受选择约束较弱^[22],而且可以方便地采用多个随机引物覆盖整个基因组,因此由 RAPD 检测出的遗传多样性水平更高。另外扩增产物以及多态位点比率均随引物本身、引物数量及样品数量而异,鉴于本研究使用的引物多达 31 个,样本数量多达 20 个,因此能够很好的覆盖所选种群所包含的遗传多样性信息^[23~25]。一个物种的进化潜力和抵御不良环境的能力取决于其遗传多样性的高低^[26]。较高的遗传多样性是羊草耐寒、耐旱、耐盐碱等的遗传基础。

表 4 由 Nei 指数估算的 5 个羊草种群的基因多样性及种群间的遗传分化

Table 4 Genetic diversity for five populations of <i>Leymus chinensis</i> and their genetic differentiation among them estimated by Nei's index										
引物 Primer	P1	P2	P3	P4	P5	HS ^①	HT ^②	DST ^③	GST ^④	Nm ^⑤
OPA01	0.272	0.576	0.467	0.390	0.526	0.446	0.521	0.074	0.143	1.501
OPA02	0.297	0.485	0.429	0.282	0.367	0.372	0.458	0.085	0.187	1.089
OPA03	0.417	0.271	0.380	0.663	0.801	0.506	0.614	0.108	0.175	1.176
OPA07	0.723	0.519	0.650	0.736	0.621	0.650	0.746	0.097	0.129	1.680
OPA08	0.523	0.000	0.420	0.245	0.610	0.360	0.474	0.114	0.241	0.786
OPA09	0.485	0.539	0.600	0.640	0.704	0.593	0.706	0.112	0.159	1.318
OPA10	0.533	0.367	0.545	0.536	0.544	0.505	0.598	0.093	0.155	1.363
OPA13	0.506	0.709	0.578	0.621	0.498	0.582	0.695	0.113	0.163	1.286
OPA18	0.000	0.621	0.649	0.665	0.551	0.497	0.571	0.074	0.129	1.686
OPA19	0.658	0.655	0.682	0.669	0.640	0.661	0.702	0.041	0.058	4.054
OPA20	0.470	0.519	0.580	0.436	0.537	0.508	0.594	0.085	0.144	1.485
OPQ03	0.586	0.638	0.619	0.789	0.757	0.678	0.752	0.074	0.099	2.275
OPQ05	0.597	0.552	0.697	0.837	0.734	0.683	0.788	0.104	0.133	1.635
OPQ06	0.423	0.511	0.497	0.392	0.717	0.508	0.603	0.095	0.157	1.342
OPQ07	0.736	0.658	0.541	0.630	0.649	0.643	0.711	0.068	0.095	2.367
OPQ09	0.506	0.707	0.506	0.634	0.581	0.587	0.680	0.093	0.137	1.578
OPQ12	0.541	0.521	0.417	0.691	0.598	0.553	0.650	0.097	0.149	1.432
OPQ14	0.597	0.633	0.583	0.545	0.721	0.616	0.702	0.086	0.122	1.794
OPQ16	0.442	0.147	0.524	0.384	0.569	0.413	0.503	0.089	0.178	1.156
OPQ17	0.771	0.454	0.721	0.547	0.744	0.648	0.689	0.041	0.0599	3.920
OPN03	0.567	0.456	0.602	0.620	0.599	0.569	0.666	0.097	0.146	1.465
OPN05	0.677	0.577	0.695	0.599	0.635	0.637	0.733	0.096	0.131	1.656
OPN08	0.499	0.671	0.599	0.523	0.595	0.578	0.682	0.104	0.153	1.381
OPN09	0.105	0.469	0.461	0.357	0.571	0.393	0.517	0.124	0.240	0.791
OPN11	0.509	0.582	0.445	0.593	0.697	0.565	0.663	0.097	0.147	1.454
OPN12	0.615	0.575	0.607	0.724	0.691	0.642	0.731	0.088	0.121	1.817
OPN13	0.521	0.643	0.568	0.539	0.547	0.564	0.664	0.101	0.151	1.400
OPN14	0.687	0.572	0.592	0.537	0.579	0.594	0.725	0.131	0.181	1.132
OPN15	0.475	0.534	0.627	0.631	0.713	0.596	0.718	0.122	0.170	1.216
OPN16	0.473	0.597	0.682	0.713	0.746	0.642	0.738	0.096	0.130	1.676
OPN20	0.332	0.613	0.777	0.659	0.760	0.628	0.742	0.114	0.153	1.381
Mean	0.501	0.528	0.575	0.572	0.632	0.562	0.656	0.09	0.146	1.622

①种群内基因多样性 Within-population gene diversity; ②总的基因多样性 Total gene diversity; ③种群间基因多样性 Between-population gene diversity; ④种群间遗传分化系数 Coefficient of genetic differentiation among populations; ⑤种群每代迁移数目 Number of migrants per generation

3.2 羊草种群的遗传分化

多态位点百分数(Polymorphism)多样性指数和 Nei 基因多样性指数是衡量种群遗传变异的几个主要指标。从上述几个指标来看,5 个羊草种群均存在丰富的遗传变异。从 Shannon 指数来看,羊草种群内的遗传多样性比率为 72.5%,而种群间的遗传多样性比

率为 27.5%，说明大部分的遗传变异存在于种群内，这符合羊草风媒异交植物的特点，与崔继哲等^[11]对松嫩草原灰绿型和黄绿型种群的分析结果较为一致。采用 Nei 指数得到的种群内与种群间的遗传分化情况与采用 Shannon 指数得到的结果基本一致，种群遗传分化系数 G_{ST} 为 0.146。繁育系统是影响种下水平遗传多样性的最重要因素^[27,28]。对于异交风媒植物来说，只有不到 10% 的变异产生于种群间的差异 ($G_{ST}=0.1$)，也就是说 90% 的遗传多样性保持在种群内部^[29]，同本文根据 Nei 指数估算的种群间遗传多样性 85.4% 相接近。另一方面，羊草为兼性生殖植物，主要靠根茎进行营养繁殖，同时有一定有性生殖能力，这种特殊的繁育系统可能使其具有特殊的种群遗传结构，不完全符合异交风媒植物的特点。

表 5 5 个羊草种群 RAPD 片断的遗传相似度(上三角)及遗传距离(下三角)

Table 5 The similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of RAPD fragments shared among five populations of *L. chinensis* detected with 31 primers

种群编号 Population code	P1	P2	P3	P4	P5
P1	—	0.5182	0.5268	0.4735	0.4738
P2	0.4818	—	0.4901	0.4524	0.4628
P3	0.4732	0.5099	—	0.5316	0.5200
P4	0.5265	0.5476	0.4684	—	0.4860
P5	0.5262	0.5372	0.4800	0.5140	—

3.3 不同羊草种群的遗传变异

从羊草的多态位点比率、Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数来看，虽然按不同指标得到的多样性的数值不同，但其所反映的种群间遗传多样性的变化趋势基本是一致的：克什克腾羊草种群的遗传多样性最高，阿巴嘎羊草种群的遗传多样性次之，霍林郭勒羊草种群的遗传多样性最低且与西乌羊草种群的遗传多样性比较接近，呈现出由东到西、由高纬度到低纬度遗传多样性逐渐增加的趋势。相关分析表明，各种群的遗传多样性与其所处的地理位置具有显著的相关性 ($P<0.05$)。从各种群的分布来看，霍林郭勒和西乌的羊草种群位于羊草分布的中心区，而阿巴嘎羊草种群接近于羊草分布的西部边缘。一般来说，一个物种的边缘分布区生境与中心区生境差异较大，自然选择压力也相对较大；此外，过度放牧和人为干扰也增加了羊草的选择压力，导致种内遗传变异的频率升高，从而使边缘区种群内积累较多的遗传变异以适应改变了的环境。本研究检测到阿巴嘎羊草种群遗传多样性较高说明了这一点。在研究区域内，克什克腾羊草种群具有最高的遗传多样性可能与其所在生境的特殊性有关。由于生境内水分条件较好，羊草种群的密度大 (208 分株/m²)，而羊草抽穗多少与密度有关，密度大抽穗多^[30]，即有性繁殖增加，必然引起种群内遗传多样性增加；而位于相似地理位置同属典型草原带的定位站种群，羊草密度小 (15 分株/m²)，此时羊草的有性生殖受到很大限制，很少能发育形成生殖枝，即使能开花结实，种子形成的幼苗比起无性系分株来成活率较低，羊草营养繁殖 (根茎分蘖) 的增加及有性繁殖率的下降必然引起该种群内多样性的降低；霍林郭勒羊草种群位于大兴安岭西南翼山前丘陵，属草甸草原，羊草生长的水分条件较好，自然选择压力较小，而且该地区全年温度较低，不利于羊草的开花结实，羊草以根茎繁殖为主，因此种群的遗传多样性最低。

3.4 种群间的遗传相似度、遗传距离及聚类分析

从羊草种群间的遗传相似度和遗传距离来看，最大遗传距离存在于地理距离较大的西乌种群与定位站种群之间 (0.5476)，即二者的相似性最小；最小的遗传距离发生在地理距离较近的定位站和阿巴嘎羊草种群之间 (0.4684)；克什克腾羊草种群与阿巴嘎羊草种群、霍林郭勒羊草种群与西乌羊草种群之间的遗传距离都较小，分别为 0.4800 和 0.4818，反映出地理距离较近种群间的遗传差异相对较小。相关分析表明，羊草种群间的遗传距离与种群所处纬度和经度的差异均呈正相关 (r 分别为 0.6109 和 0.4447)，即与地理距离具有一定的相关性，较符合“距离-隔离”模型。钱吉等^[11]在 DNA 混合样品基础上，研究了不同种群羊草的遗传分化及水分因子对羊草遗传分化的影响，也得到相似结论，相邻种群遗传距离较小，随着水因子在内蒙古高原上连续的梯度变化，羊草各种群间也呈连续的倾群变异。聚类结果 (图 1) 也显示，地理距离较远的种群总是最后聚在一起。

本研究中地理距离最近的定位站羊草种群和克什克腾羊草种群间的遗传距离为 0.5140，大于 5 个种群的平均遗传距离 (0.5095)，反映出羊草种群间遗传分化格局的复杂性。这种复杂性可能与各种群的原分布中心、进化过程及种群间的基因交流等多种因素有关。有研究表明，在地理距离较小的种群间，遗传距离与地理距离之间没有显著相关性^[6]，遗传分化可能是因为其它的单个因子或几个因子的综合作用来决定的^[12]。克什克腾羊草种群与定位站种群所处地理位置相近，年降水量、光温等气

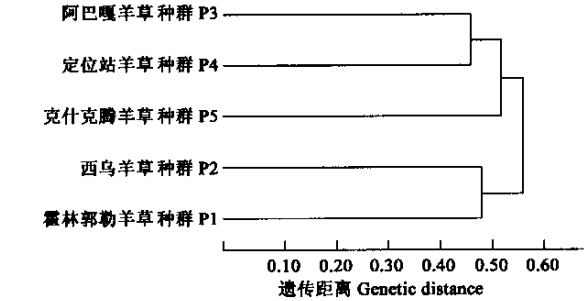


图 1 内蒙古不同地理种群羊草的 RAPD 聚类分析
Fig. 1 Cluster analysis of different geographic populations of *Leymus chinensis* in Inner Mongolia using RAPD data

候条件一致,但由于两者在土壤水分状况和羊草本身在群落中的生长繁殖状况有明显差异,二者实际的遗传距离远大于由地理距离推测的预期值,所以在聚类时二者并未首先聚集。

3.5 羊草遗传多态性的维持机制

种群是物种进化的基本单位,种群遗传结构是一个物种最基本的特征之一。因自然或人为原因发生突变、基因流、选择和遗传漂变,种群间可能发生遗传分化。羊草是欧亚草原区广泛分布的多年生草本植物,兼性生殖,以根茎繁殖为主,同时以异交授粉进行有性繁殖。这种特殊的生活史使种、种群产生并维持很高的遗传变异性。本文根据种群间遗传分化系数 G_{ST} 计算了种群每代迁移数目 N_m ,得到的 N_m 大于 1,即说明羊草种群间的基因流强度较大。较大的基因流可防止由遗传漂变引起的种群之间的遗传分化,这也符合异交植物的特点。所以,维持羊草遗传多态现象的机制不是遗传漂变。另一方面,以上研究的羊草种群分布较为连续,种群间并不缺乏有效的基因流。据此可以认为,不同地理种群羊草的遗传分化和变异与纬度、经度具有一定相关性,自然选择的压力显得较为重要;小地区范围内羊草种群间的遗传分化主要是由环境的异质性所引起的。

References:

[1] Chalmers K J, Waugh R, Sprent J I, *et al.* Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*,1992,**69**:465~472.

[2] Russel J R, Hosein F, Johnson E, *et al.* Genetic differentiation of coca (*Theobroma cacao*) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.*,1993,**2**:89~97.

[3] Soren B, Crawford D J, Stuessy T F. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family *Lactoridaceae*. *Amer. J. Bot.*,1992,**79**:1436~1439.

[4] Yun R, Zhong M, Wang H X, *et al.* Study on DNA diversity of LiaoDong oak population at DongLing mountain region, Beijing. *Acta Botanica Sinica*, 1998, **40**(2):169~175.

[5] Qian W, Ge S, Hong D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPD and ISSRs. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(7):741~750.

[6] Fu Y L, Qian J, Ma Y H, *et al.* Genetic differentiation research on populations of wild soybeans in different scales. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, **22**(2):176~184.

[7] Lu J M, Li J D. Comparative study on anatomical construction of the same plants from different habitats. *Journal of Northeast Normal University*, 1994, **3**:100~103.

[8] Lu J M, Li J D, Hu A L, *et al.* Ecological and evolutionary morphological characteristics of *Aneurolepidium chinense* population. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 1996, **7**(1):44~48.

[9] Qian J, Ren W W, Zheng S Z. Comparative study of young *Leymus chinensis*'s electrical resistance and conductivity of different geographic population. *Acta Phytoecologica Sinica*, 1997, **2**(1):38~43.

[10] Ren W W, Qian J, Ma J, *et al.* Comparative study of *Leymus chinensis*'s water content and free proline of different geographic populations under the force of different consistency PEG. *Acta Ecologica Sinica*, 2000, **20**(2):349~352.

[11] Qian J, Ma Y H, Ren W W, *et al.* Comparative study on ecotype differentiation of *Leymus chinensis* in different geographic populations at molecular level. *Acta Ecologica Sinica*, 2000, **20**(3):440~443.

[12] Ren W W, Qian J, Zheng S Z. A comparative study on genetic differentiation of *Leymus chinensis* in different geographic populations. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **19**(5):689~696.

[13] Hu B Z, Liu D, Hu G F, *et al.* Morphological variation and genetic diversity in *Aneurolepidium chinense*. *Acta Phytoecologica Sinica*, 2001, **25**(1):83~89.

[14] Cui J Z, Zu Y G, Nie J C. Genetic differentiation in *Leymus chinensis* populations revealed by RAPD markers II. Statistics analysis. *Acta Ecologica Sinica*,2002, **22**(7): 983~989.

[15] Liu H F, Gao Y B, Wang D, *et al.* Genetic differentiation in eight populations of *Leymus chinensis* in Inner Mongolia Steppe. *Acta Ecologica Sinica*,2004, **24**(3): 423~431.

[16] Clark M S Translated by Gu H Y, Qu L J. Plant molecular biology——a laboratory manual. Beijing:China Higher Education Press, 1998.

[17] Nei M. *Molecular Population Genetics and Evolution*. North Holland Publ. Co., Amsterdam and New York, 1975.

[18] Nei M. Esitimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, **19**:583~590.

[19] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**:5269~5273.

[20] Rohlf F J. NTSYS-PC 2. 01. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, New York, 1997.

[21] Cui J Z, Qiu L Y, Zu Y G. Genetic diversity and differentiation of two ecotypes of *Leymus chinensis* populations in microhabitat - allozyme analysis. *Acta Ecologica Sinica*, 2000, **20**(3):434~439.

[22] Lynch M, Milligam B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.*, 1994, **3**:91~97.

[23] Hardrvs H. Applications of random amplified polymorphic DNA(RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1992, **1**:55~63.

[24] Kongkiatugam P, Waterway M J, Fortin M G, *et al.* Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. *Euphytica*, 1995, **84**:237~246.

[25] Dawson I K, Chalmers K J, Waugh R, *et al.* Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel RAPD. *Molecular Ecology*, 1993, **2**:151~159.

[26] Millar C I,Libby W J. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species. In: Falk D A, K E Holsinger eds. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press,1991. 149~170.

[27] Ge S, Hong D Y. Genetic diversity and its test methods. In:Qian Y Q. *Principles and Study Methods of Biological Diversity*. Beijing: Science and Technology Press,1994. 123~140.

[28] Wang H X, Hu Z A. Plant breeding system , genetic structure and genetic diversity protection. *Chinese Biodiversity*,1996,**4**(2):92~96.

[29] Hamrick J L, Godt M J. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, *et al.* eds. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland, MA: Sinauer, 1990. 43~63.

[30] Chen M, Li Z H, Piao S J. The observation and research on reproductive characteristics of *Aneurolepidium chinensis*. *Research on Grassland Ecosystem*, 1988, **2**:193~208.

参考文献:

[4] 恽锐,钟敏,王洪新,等. 北京东灵山辽东栎种群 DNA 多样性的研究. 植物学报, 1998, **40**(2):169~175.

[5] 钱韦,葛颂,洪德元. 用 RAPD 和 ISSRs 估计粒用水稻(*Oryza granulata*)的遗传分化. 植物学报, 2000, **42**(7):741~750.

[6] 府宇雷,钱吉,马玉虹,等. 不同尺度下野大豆种群的遗传分化. 生态学报, 2002, **22**(2):176~184.

[7] 陆静梅,李建东. 同种不同生态环境植物解剖结构比较研究. 东北师范大学学报自然科学版,1994,**3**:100~103.

[8] 陆静梅,李建东,胡阿林,等. 羊草种群生态和演化形态学特性的比较研究. 应用生态学报, 1996,**7**(1):44~48.

[9] 钱吉,任文伟,郑师章. 不同地理种群羊草苗期电导、电阻的比较. 植物生态学报, 1997, **2**(1):38~43.

[10] 任文伟,钱吉,马骏,等. 不同地理种群羊草在聚乙二醇胁迫下含水量和游离脯氨酸含量的比较. 生态学报, 2000, **20**(2):349~352.

[11] 钱吉,马玉虹,任文伟,等. 不同地理种群羊草分子水平上生态型分化的研究. 生态学报, 2000, **20**(3): 440~443.

[12] 任文伟,钱吉,郑师章. 不同地理种群羊草的遗传分化. 生态学报, 1999, **19**(5):689~696.

[13] 胡宝忠,刘娣,胡国富,等. 羊草遗传多样性研究. 植物生态学报, 2001, **25**(1):83~89.

[14] 崔继哲,祖元刚,聂江城. 羊草种群遗传分化的 RAPD 分析 II .RAPD 数据的统计分析. 生态学报, 2002, **22**(7):983~989.

[15] 刘惠芬,高玉葆,王丹,等. 内蒙古典型草原养草种群遗传分化的 RAPD 分析. 生态学报, 2004,**24**(3):423~431.

[21] 崔继哲,曲来叶,祖元刚. 微生境下羊草两种生态型种群的遗传多样性及遗传分化——等位酶分析. 生态学报, 2000, **20**(3):434~439.

[27] 葛颂,洪德元. 遗传多样性及其检测方法. 见:钱迎倩. 生物多样性研究的原理与方法. 北京: 中国科学技术出版社,1994. 123~140.

[28] 王洪新,胡志昂. 植物繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护. 生物多样性,1996,**4**(2):92~96.

[30] 陈敏,李忠厚,朴顺姬. 羊草繁殖特性的观察及研究. 草原生态系统研究. 1988, **2**:193~208.