

用 RAPD 检测华山新麦草自然居群的遗传结构和居群分化

王 丽, 杨 娟, 郭 晶, 赵桂仿*

(西北大学生命科学学院, 秦岭生物多样性研究中心, 西安 710069)

摘要: 华山新麦草特产于我国陕西华山, 为国家一级重点保护植物。应用 RAPD 技术, 用 20 条随机引物对黄埔峪、仙峪、华山峪 3 个居群不同海拔的 13 个亚居群共 266 个华山新麦草取样个体进行扩增, 共得 122 个扩增片段。平均每个引物得到的扩增片段数为 6.1 (2~10)。实验数据的统计分析表明: 黄埔峪居群的多态性位点比率为 60.66%, 仙峪居群的多态性位点比率为 90.98%, 华山峪居群的多态性位点比率为 95.08%, 总的多态性位点比率为 95.08%, 说明华山新麦草具有较高的遗传变异性。Shannon 多样性指数 (0.3306) 和基因分化系数 ($G_{ST}=0.3263$) 揭示了华山新麦草居群遗传变异多存在于亚居群内。华山新麦草亚居群间的基因流 $Nm=1.0322$, 低于一般风媒传粉植物 ($Nm=5.24$) 的基因流水平。亚居群间平均的遗传距离为 0.1571 (变化范围: 0.0022~0.2901), 最大的遗传距离值出现在黄埔峪亚居群 (hp1) 和华山峪高海拔亚居群 (h8) 之间, 仙峪亚居群与华山峪高海拔亚居群之间以及华山峪高海拔亚居群与低海拔亚居群之间的遗传距离值也较大。遗传距离与海拔垂直距离之间的相关性分析表明二者有显著的相关性 ($p<0.01$)。聚类分析和主成分分析也显示华山新麦草自然居群已发生明显分化, 主要表现为黄埔峪居群、仙峪居群与华山峪居群间的分化及华山峪高海拔亚居群与低海拔亚居群间的分化。

关键词: 华山新麦草; RAPD; 遗传结构; 遗传多样性

Genetic structure and differentiation of *Psathyrostachys huashanica* populations detected with RAPD markers

WANG Li, YANG Juan, GUO Jing, ZHAO Gui-Fang (School of Life Science, Biodiversity Research Center of Qinling Mts, Northwest University, Xi'an 710069, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(4): 719~726.

Abstract: *Psathyrostachys huashanica* Keng is a perennial grass and belongs to genus *Psathyrostachys* in Triticeae. *Psathyrostachys* distributes in center of middle Asia and Caucasus Mt., while *P. huashanica*, a species endemic to China, is only located in Mountain Hua in Shaanxi Province. At present, the populations of this species are decreasing, and reaching the edge of extinction. Due to the distributing limitation and importance as breeding material for germplasm storage, it has been considered as the first class of national protected rare plants. For this reason, the present study is significant in probing plant flora, origin and evolution of Triticeae and crop breeding.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to analyze genetic structure and differentiation of *P. huashanica* populations sampled in three valleys (Huangpu, Xian and Huashan Valleys) in Mt. Hua. One hundred and twenty-two RAPD fragments were obtained in all 266 individuals with 20 primers with mean of 6.1 (2~10) fragments per primer. The percentage of polymorphic loci (PPB) is 60.66% in Huangpu Valley, 90.98% in Xian Valley, 95.08% in Huashan Valley, and the total PPB is 95.08%, which indicated a highly genetic variability of *P. huashanica*. The Shannon's Information index and G_{ST} are 0.3306 and 0.3263, respectively, indicating that there were more genetic variations within the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770087); 陕西省自然科学基金资助项目 (2001SM20)

收稿日期: 2004-06-07; **修订日期:** 2005-02-11

作者简介: 王丽 (1976~), 女, 新疆奇台人, 博士生, 主要从事植物解剖和分子生态学研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: gzfzhao@nwwu.edu.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 39770087) and Shaanxi Natural Science Foundation (No. 2001SM20)

Received date: 2004-06-07; **Accepted date:** 2005-02-11

Biography: WANG Li, Ph. D., mainly engaged in molecular ecology and plant anatomy.

subpopulations than those among the subpopulations. The gene flow among the subpopulations of *P. huashanica* ($Nm = 1.0322$) is much less than that of the common anemophytes ($Nm = 5.24$). Mean genetic distance is 0.1571 (range: 0.0022~0.2901). The highest value of genetic distance was found between the subpopulations (hp1) of Huangpu Valley and the highest altitude subpopulation (h8) of Huashan Valley. Correlation analysis detected significant correlation between genetic distance and vertical distance of altitude. Clustering analysis and principal coordinate analysis revealed the genetic differentiation among the populations of *P. huashanica*. Differentiation mainly occurred between the higher altitude subpopulations and the lower altitude subpopulations, suggesting that altitude might be the major factor that restricted the gene flow between different altitude subpopulations and resulted in differentiation of subpopulations.

Key words: *Psathyrostachys huashanica*; RAPD; genetic structure; genetic diversity

文章编号: 1000-0933(2005)04-0719-08 中图分类号: Q346, Q948 文献标识码: A

华山新麦草(*Psathyrostachys huashanica* Keng)属于禾本科大麦族新麦草属多年生草本植物,是我国特有种,仅产于陕西华山^[1]。新麦草属是小麦属的近缘属^[2],因此,华山新麦草的研究对探讨小麦属的起源与进化有着重要价值。同时由于华山新麦草具有抗旱、抗病虫、耐盐、成熟早等特点,因此受到了植物学家,尤其是植物育种工作者的重视^[3~7]。目前该种已被列为国家一级珍稀濒危保护植物和急需保护的农作物野生近缘种^[8~10]。以往的研究表明华山新麦草自然居群沿海拔梯度存在遗传分化^[11]。应用等位酶标记研究发现,华山新麦草自然居群内具有较高的遗传多态性^[12]。此外,对华山新麦草濒危原因中的环境因素及种群繁殖对策也进行了一些研究^[13]。为了更好的保护这种野生的种质资源,本文用 RAPD 技术对华山新麦草自然居群的遗传结构和种内遗传多态性进行全面系统的研究,研究结果可为遗传育种和这种植物的保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 野外取样

材料采集于 2000 年至 2002 年的 4 月至 5 月间进行,此时正是华山新麦草的盛花期,可依据其穗状花序特征准确鉴别。采样在华山的黄埔峪、仙峪和华山峪(居群)分别进行。在每个山峪,沿地理距离或海拔梯度设定若干样带(亚居群)(表 1)。由于华山新麦草具有根状茎,可进行克隆生长,因此采样时个体间的距离都在 1m 以上,以确保同一基因型不被重复采样。随机采集样方中若干健康、无锈斑叶片,经硅胶迅速干燥后,带回实验室置于一 80℃ 超低温冰箱中贮存备用。

1.2 DNA 提取与引物筛选

本研究采用改良的 2×CTAB 法^[14]提取华山新麦草的总 DNA。在研磨过程中,加入适量 PVP 和抗坏血酸;温浴 1h 至 2h;氯仿-异戊醇溶液抽提;获得的 DNA 溶于适量 0.1×TE 缓冲液中(10ng/μl),且在一 20℃ 保存备用。100 条购自上海博亚生物技术有限责任公司的随机引物,经预实验筛选出对全部 DNA 样品都有清晰、稳定扩增产物的 20 条引物(表 2),对所有 266 个个体进行 PCR 扩增。

表 1 3 个居群 13 个亚居群的海拔与采集个体数
Table 1 Altitude and number of individuals sampled in thirteen subpopulations of three valleys

采样地点 Location	编号 Serial number	平均海拔(m) Average altitude	个体数 Number of individuals
黄埔峪	hp1	370	21
	hp2	560	20
仙峪	x1	350	21
	x2	400	20
	x3	530	20
华山峪	玉泉院	h1 483(460~510)	20
	五里关	h2 684(640~710)	22
	青柯坪	h3 930(850~1030)	21
	回心石	h4 1265(1230~1280)	21
	百尺峡	h5 1350(1310~1400)	20
	北峰	h6 1559(1550~1610)	20
	东峰	h7 2000	20
	南峰	h8 2140	20

表 2 本研究所选用的随机引物
Table 2 Random primers used in this study

编号 Serial number	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	编号 Serial number	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	编号 Serial number	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	编号 Serial number	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
BA0017	AGGGAACGAG	BA0031	CAATCGCCGT	BA0047	TTGGCACGGG	BA0079	GTTGCCAGCC
BA0027	GAAACGGGTG	BA0033	CAGCACCCAC	BA0048	GTGTGCCCCA	BA0080	ACTTCGCCAC
BA0028	GTGACGTAGG	BA0039	CAAACGTCGG	BA0051	AGCGCCATTG	BA0123	CCTGATCACC
BA0029	GGGTAACGCC	BA0040	GTGCGATCC	BA0068	TGGACCGGTG	BA0379	CACAGCGGGA
BA0030	GTGATCGCAG	BA0042	GGACCCAACC	BA0075	GACGGATCAG	BA1020	GGAAGGTGAG

1.3 随机扩增与产物检测

PCR 扩增的反应体系为:总反应体积 15μl,其中 10×反应缓冲液(100mmol/L KCl, 80mmol/L (NH₄)₂SO₄, 100mmol/L Tris-HCl, PH 9.0, NP-40)1.5μl, MgCl₂(25mmol/L)1.13μl, dNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP, 10mmol/L each)0.45μl, 模板 DNA (10ng/μl)1.5μl, 随机引物 (0.7μmol/L)6μl, Taq 酶(5u/μl, 上海 Sangon)0.3μl, 超纯水 4.1μl, 最后在反应混合液上覆盖 15μl 矿物油。在 TGradient(Biometra, Whatman. Techné(Cambridge)Limited, United Kingdom)PCR 扩增仪上进行 DNA 扩增。反应程序为:96℃预变性 5min 30s;接着 94℃变性 1min 10s, 40℃复性 1min 和 72℃延伸 1min 30s, 进行 40 个循环;最后 72℃延伸 10min。扩增产物用 1.8%琼脂糖(含 0.5mg/ml EB)凝胶电泳分离, 电压 55V, 电泳缓冲液为 1×TAE, 以 DGL2000 作为分子量标准(北京鼎国生物技术发展中心), 电泳 2h。在 UV 光下检测 PCR 扩增产物并通过 Kodak Scientific Imaging Systems 凝胶成像系统 120(Estman Kodak Company)摄像。

1.4 扩增产物的记录与数据分析

试验中利用“1”和“0”记录 RAPD 片段的“有”(显性)和“无”(隐性), 获得 0、1 二元数据列。利用 POPGENE^[15]软件包分析华山新麦草的多态位点比率(*PPB*)、Shannon 多样性指数和 Nei 基因多样性指数, 并估算各亚居群间的遗传距离, 居群基因流(*N_m*)及基因分化系数(*G_{ST}*)。采用 UPGMA 法(Unweighted pair-group method with arithmetic averaging)进行聚类分析, 并构建树形图。同时利用 SPSS 10.0 软件进行 PCA 分析(Principal Components Analysis), 用以讨论各亚居群个体的空间分布。另外分别对华山新麦草亚居群内的遗传多样性指标与海拔进行了相关性分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 多态性位点比率(*PPB*)

利用 20 条随机引物对华山新麦草 13 个亚居群 266 个个体的 122 个位点进行 RAPD 扩增, 发现其中 116 个位点是多态的。在居群水平上, 华山新麦草总的多态位点比率 *PPB*=0.9508(表 3)。从表 3 可以看出, 华山峪居群(*PPB*=0.9508)的多态位点比率最大, 其次是仙峪居群(*PPB*=0.9098), 黄埔峪居群(*PPB*=0.6066)的多态位点比率最小。按实验检测得到的多态位点比率大小排列各亚居群顺序为:h4>h5>x1>x3>h3, x2>h2>h6>h7>h8, hp1>h1>hp2。

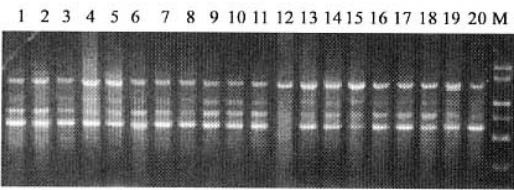


图 1 用 BA0029 对华山新麦草 hp2 亚居群的扩增

Fig. 1 Amplified products of subpopulation hp2 of *P. huashanica* using primer BA0029

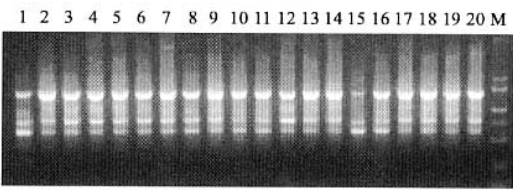


图 2 用 BA0033 对华山新麦草 h8 亚居群的扩增

Fig. 2 Amplified products of subpopulation h8 of *P. huashanica* using primer BA0033

2.2 华山新麦草自然居群的遗传结构

Shannon 多样性指数分析显示, 在 13 个华山新麦草亚居群中, 亚居群 h1 的多样性最低, 为 0.2609; 亚居群 h4 的最高, 为 0.3891。总的种内遗传多样性(*H_{SP}*)为 0.4849, 亚居群内多样性比率(*H_{POP}/H_{SP}*)为 0.6694, 亚居群间(*H_{SP} - H_{POP}/H_{SP}*)则为 0.3306(表 4)。

Nei 指数计算的华山新麦草居群总的基因多样性(*H_T*)为 0.3198, 亚居群内基因多样性(*H_S*)为 0.2158, 亚居群间的遗传分化系数(*G_{ST}*)为 0.3263(表 4)。对亚居群水平而言, 亚居群 h1 的基因多样性最低, 为 0.1739; 亚居群 h4 的最高, 为 0.2599。Shannon 多样性指数与 Nei 基因多样性指数显示出基本一致的规律。根据以上计算结果, 各亚居群基因多样性按顺序排列如下:h4>x1>h6>h5, x3>x2>h8>h7>hp1>h2>h3>hp2>h1。

华山新麦草 3 个居群的 RAPD 数据分析表明黄埔峪居群的多态位点比率(*PPB*)、观测等位基因数(*na*)、有效等位基因数(*ne*)、Nei 基因多样性指数(*h*)和 Shannon 指数(*I*)及基因分化系数(*G_{ST}*)均低于其它两个居群, 华山峪居群各项在 3 个居群中是最高的(表 5)。

2.3 华山新麦草亚居群间的遗传距离与聚类分析(UPGMA 法)

通过华山新麦草亚居群的遗传距离分析结果可知(表 6), 13 个亚居群间的遗传距离范围从 0.0022 至 0.2901, 平均距离为 0.1571。其中, 亚居群 hp1 与亚居群 h8 之间的遗传距离最大(*D_{max}*=0.2901), 亚居群 h2 与亚居群 h3 之间的遗传距离最小(*D_{min}*=0.0022)。

从表 5 中还可可见, 华山新麦草亚居群间遗传一致度(*GI*)以亚居群 h2 和亚居群 h3 间最大(*GI_{max}*=0.9978), 亚居群 hp1 和

表 3 各引物检测华山新麦草亚居群多态位点的数量(括弧里是多态位点的比率)

Table 3 Polymorphic loci detected with twenty primers for thirteen subpopulations of *P. huashanica* (proportion of polymorphic loci)

引物 Primer	亚居 群 1 hp 1	亚居 群 2 hp2	亚居 群 3 h1	亚居 群 4 h2	亚居 群 5 h3	亚居 群 6 h4	亚居 群 7 h5	亚居 群 8 h6	亚居 群 9 h7	亚居 群 10 h8	亚居 群 11 x1	亚居 群 12 x2	亚居 群 13 x3	黄埔峪 hp	华山峪 h	仙峪 x	总数 Total loci
BA0017	1(0.17)	1(0.17)	3(0.50)	1(0.17)	0(0.00)	1(0.17)	0(0.00)	3(0.50)	2(0.33)	3(0.50)	2(0.33)	5(0.83)	5(0.83)	1(0.17)	6(1.00)	6(1.00)	6(1.00)
BA0027	5(0.63)	2(0.25)	4(0.50)	3(0.38)	3(0.38)	6(0.75)	5(0.63)	8(1.00)	8(1.00)	7(0.86)	6(0.75)	3(0.38)	5(0.63)	5(0.63)	8(1.00)	7(0.88)	8(1.00)
BA0028	1(0.50)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.50)	1(0.50)	1(0.50)	1(0.50)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.50)	1(0.50)	1(0.50)	1(0.50)	1(0.50)	1(0.50)
BA0029	4(0.80)	3(0.60)	3(0.60)	4(0.80)	4(0.80)	5(1.00)	2(0.40)	4(0.80)	4(0.80)	3(0.60)	3(0.60)	4(0.80)	5(1.00)	4(0.80)	5(1.00)	5(1.00)	5(1.00)
BA0030	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)	5(0.63)	7(0.88)	8(1.00)	6(0.75)	5(0.63)	5(0.63)	6(0.75)	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)
BA0031	6(0.86)	5(0.71)	2(0.29)	6(0.86)	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)	4(0.57)	4(0.57)	3(0.43)	2(0.29)	6(0.86)	6(0.86)	6(0.86)	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)
BA0033	1(0.20)	2(0.40)	2(0.40)	4(0.80)	2(0.40)	4(0.80)	3(0.60)	2(0.40)	1(0.20)	0(0.00)	1(0.20)	2(0.40)	3(0.60)	2(0.40)	4(0.80)	4(0.80)	4(0.80)
BA0039	3(0.43)	4(0.57)	3(0.43)	4(0.57)	5(0.71)	7(1.00)	6(0.86)	6(0.86)	5(0.71)	7(1.00)	7(1.00)	2(0.29)	7(1.00)	4(0.57)	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)
BA0040	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)	5(0.71)	6(0.86)	7(1.00)	7(1.00)	4(0.57)	4(0.57)	5(0.71)	7(1.00)	6(0.86)	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)
BA0042	5(0.83)	5(0.83)	5(0.83)	4(0.67)	4(0.67)	5(0.83)	6(1.00)	5(0.83)	5(0.83)	5(0.83)	5(0.83)	5(0.83)	5(0.83)	6(1.00)	6(1.00)	6(1.00)	6(1.00)
BA0047	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(0.40)	2(0.40)	4(0.80)	4(0.80)	1(0.20)	1(0.20)	3(0.60)	1(0.20)	1(0.20)	2(0.40)	0(0.00)	4(0.80)	2(0.40)	4(0.80)
BA0048	5(0.71)	4(0.57)	5(0.71)	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)	5(0.71)	4(0.57)	4(0.57)	6(0.86)	7(1.00)	5(0.71)	5(0.71)	5(0.71)	7(1.00)	7(1.00)	7(1.00)
BA0051	3(0.38)	3(0.38)	5(0.63)	7(0.88)	7(0.88)	6(0.75)	7(0.88)	6(0.75)	6(0.75)	2(0.25)	7(0.88)	6(0.75)	5(0.63)	3(0.38)	7(0.88)	7(0.88)	7(0.88)
BA0068	0(0.00)	0(0.00)	1(0.20)	3(0.60)	3(0.60)	3(0.60)	4(0.80)	4(0.80)	4(0.80)	1(0.20)	4(0.80)	2(0.40)	1(0.20)	0(0.00)	4(0.80)	4(0.80)	4(0.80)
BA0075	0(0.00)	2(0.20)	5(0.50)	6(0.60)	7(0.70)	7(0.70)	8(0.80)	5(0.50)	5(0.50)	2(0.20)	8(0.80)	8(0.80)	8(0.80)	2(0.20)	10(1.00)	8(0.80)	10(1.00)
BA0079	1(0.33)	1(0.33)	2(0.67)	2(0.67)	1(0.33)	2(0.67)	3(0.67)	1(0.33)	1(0.33)	0(0.00)	2(0.67)	2(0.67)	1(0.33)	1(0.33)	2(0.67)	2(0.67)	2(0.67)
BA0080	8(1.00)	6(0.75)	1(0.13)	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)	7(0.88)	6(0.75)	6(0.75)	6(0.75)	8(1.00)	6(0.75)	7(0.88)	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)	8(1.00)
BA0123	4(0.80)	4(0.80)	4(0.80)	5(1.00)	4(0.80)	4(0.80)	5(1.00)	5(1.00)	5(1.00)	3(0.60)	5(1.00)	5(1.00)	5(1.00)	4(0.80)	5(1.00)	5(1.00)	5(1.00)
BA0379	2(0.50)	3(0.75)	4(1.00)	3(0.75)	3(0.75)	3(0.75)	4(1.00)	1(0.25)	1(0.25)	0(0.00)	3(0.75)	3(0.75)	3(0.75)	3(0.75)	4(1.00)	4(1.00)	4(1.00)
BA1020	4(0.67)	3(0.50)	2(0.33)	2(0.33)	3(0.50)	2(0.33)	5(0.83)	4(0.67)	4(0.67)	6(1.00)	6(1.00)	3(0.50)	2(0.33)	4(0.67)	6(1.00)	6(1.00)	6(1.00)
Total loci (%)	68 (55.74)	63 (51.64)	66 (54.10)	82 (67.21)	83 (68.03)	97 (79.51)	94 (77.05)	78 (63.93)	75 (61.48)	68 (55.74)	92 (75.41)	83 (68.03)	91 (74.59)	74 (60.66)	116 (95.08)	111 (90.98)	116 (95.08)

亚居群 h8 间最小($GI_{\min}=0.7482$),结果与遗传距离分析基本一致(表 6)。

表 4 华山新麦草 13 个亚居群的遗传多样性特征指数分析

Table 4 Genetic diversity index analysis of <i>P. huashanica</i> thirteen subpopulations			
Shannon 指数 Shannon diversity index	平均 Mean	Nei' 基因多样性指数 Nei's gene diversity index	平均 Mean
hp1	0.3076	hp1	0.2086
hp2	0.2759	hp2	0.1859
h1	0.2609	h1	0.1739
h2	0.3013	h2	0.1966
h3	0.299	h3	0.1945
h4	0.3891	h4	0.2599
h5	0.3549	h5	0.2319
h6	0.3446	h6	0.232
h7	0.3136	h7	0.2095
h8	0.3119	h8	0.2117
x1	0.3699	x1	0.2447
x2	0.3372	x2	0.2232
x3	0.3539	x3	0.2319
亚居群内平均遗传多样性 H_{POP}	0.3246	亚居群内基因多样性 H_{S}	0.2158
总的种内遗传多样性 H_{SP}	0.4849	居群内总的基因多样性 H_{T}	0.3198
亚居群内遗传多样性比率 $H_{\text{POP}}/H_{\text{SP}}$	0.6694	亚居群内基因多样性比率 $H_{\text{S}}/H_{\text{T}}$	0.6747
亚居群间遗传多样性比率 $(H_{\text{POP}}-H_{\text{SP}})/H_{\text{SP}}$	0.3306	基因分化系数 G_{ST}	0.3263

表 5 华山新麦草 3 个居群遗传多样性的分布

Table 5 Genetic diversity of <i>P. huashanica</i> in three valleys							
POP	样本大小 Sample size	PPB	na	ne	h	I	G _{ST}
黄埔峪(hp)	41	60.66	1.6066	1.3812	0.2196	0.3262	0.1006
华山峪(h)	164	95.08	1.9508	1.5000	0.3041	0.4644	0.2986
仙峪(x)	61	90.98	1.9098	1.5011	0.2948	0.4449	0.2086
总计 Total	266	95.08	1.9508	1.5302	0.3198	0.4849	0.3263

表 6 华山新麦草 13 个亚居群基于 Nei 指数的遗传距离和遗传一致度分析(下三角数据为遗传距离)

Table 6 Analysis of genetic distance and genetic identity among thirteen subpopulations of *P. huashanica* based on Nei's gene diversity index (Genetic distances below diagonal)

Spop	hp1	hp2	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	x1	x2	x3
hp1	* * * *	0.9451	0.7765	0.8592	0.8530	0.8710	0.8668	0.8209	0.8297	0.7482	0.8189	0.8487	0.8285
hp2	0.0564	* * * *	0.7783	0.8839	0.8788	0.8827	0.8738	0.8477	0.8567	0.7586	0.8489	0.8701	0.8392
h1	0.2530	0.2506	* * * *	0.8491	0.8520	0.8204	0.8466	0.8252	0.8193	0.7599	0.8720	0.8241	0.8908
h2	0.1518	0.1234	0.1635	* * * *	0.9978	0.9276	0.9096	0.8712	0.8794	0.7791	0.8872	0.8657	0.8888
h3	0.1590	0.1292	0.1602	0.0022	* * * *	0.9256	0.9067	0.8679	0.8760	0.7821	0.8879	0.8679	0.8870
h4	0.1381	0.1248	0.1980	0.0751	0.0773	* * * *	0.9554	0.8924	0.8979	0.8056	0.8433	0.8581	0.8818
h5	0.1429	0.1349	0.1665	0.0947	0.0980	0.0456	* * * *	0.9129	0.9196	0.8155	0.8710	0.8585	0.8977
h6	0.1974	0.1653	0.1922	0.1379	0.1416	0.1139	0.0912	* * * *	0.9957	0.8130	0.8488	0.8305	0.8357
h7	0.1867	0.1546	0.1993	0.1286	0.1324	0.1078	0.0838	0.0043	* * * *	0.8113	0.8492	0.8330	0.8373
h8	0.2901	0.2763	0.2746	0.2497	0.2458	0.2162	0.2039	0.2070	0.2092	* * * *	0.7609	0.7686	0.7873
x1	0.1998	0.1638	0.1370	0.1197	0.1189	0.1704	0.1381	0.1640	0.1635	0.2732	* * * *	0.8807	0.8905
x2	0.1641	0.1392	0.1934	0.1442	0.1417	0.1531	0.1526	0.1857	0.1827	0.2632	0.1270	* * * *	0.8683
x3	0.1882	0.1753	0.1156	0.1179	0.1200	0.1258	0.1079	0.1795	0.1776	0.2391	0.1160	0.1413	* * * *

基于 Nei 遗传距离,利用 UPGMA 法对华山新麦草 13 个亚居群间的遗传关系进行了聚类分析,结果如图 3 所示:13 个亚居群可归并为四大支:第 1 支为黄埔峪的两个亚居群 hp1 和 hp2。第 2 支包括 6 个分支,即华山峪亚居群 h2,h3,h4,h5,h6 和 h7,其中较低海拔的亚居群 h2,h3,h4,h5 聚为一支,较高海拔的亚居群 h6 和 h7 聚为一支。第 3 支包括仙峪 3 个亚居群和华山峪低海拔亚居群 h1。华山峪高海拔亚居群 h8 单独为一支。华山峪低海拔亚居群 h1 与仙峪亚居群存在交错现象。聚类分析结果与华山新麦草的实际地理分布基本一致。

2.4 主成分分析(PCA)

PCA 排序中,前几个主分量所含信息百分比是反映排序顺序效果优劣的主要标志之一。本研究结果表明,266 个个体在前 3 个主分量中占总信息量的 55.99%。第 1 主分量(Factor 1)包含的信息量为 26.19%(X 轴),第 2 主分量(Factor 2)包含的信息量为 19.08%(Y 轴),第 3 主分量(Factor 3)包含的信息量为 10.72%(Z 轴)。

由图 4a 中可以看出,在 X 轴上华山新麦草个体投射点在-2~1 区间集中了绝大多数个体,1~3 区间则包括华山峪高海拔亚居群 h6,h7,h8 的个体;在 Y 轴上华山新麦草华山峪和仙峪居群的个体多集中在-1~2 区间,而黄埔峪居群则集中在-3~-1 区间,体现了 3 个居群的空间分布模式。通过 X-Z 二维散点图(图 4b)可以看出,在 X 轴上华山新麦草仙峪居群集中在-2~-1 区间,黄埔峪居群集中在-1~1 区间,在 Z 轴上华山新麦草华山峪居群除 h8 外多集中在-2~0 区间,而仙峪和黄埔峪居群则集中在 0~2 区间,显示了华山新麦草沿海拔梯度分化的趋势。这与前面的聚类分析结果基本一致(图 3)。

2.5 华山新麦草亚居群遗传多样性与其海拔的相关性分析

通过对华山新麦草的多态位点比率(*PPB*)、观测等位基因数(*na*)、有效等位基因数(*ne*)、Nei 基因多样性指数(*h*)、Shannon 多样性指数(*I*)与其海拔高度(*a*)分别进行相关性研究,结果表明华山新麦草的海拔高度和各多样性指标之间几乎没有相关性。

在华山新麦草 13 个亚居群彼此间的遗传距离与海拔高度距离的相关性分析中发现,华山新麦草亚居群间遗传距离与其各自相应的海拔垂直距离之间有显著的相关性,Pearson 相关系数为 0.504**($p<0.01$)。说明华山新麦草亚居群间的遗传距离与海拔高度差异之间有很大的关系。

3 讨论

3.1 华山新麦草自然居群的遗传多样性

根据用 RAPD 遗传标记对华山新麦草自然居群的分析,总的多态性位点比率为 95.08%,黄埔峪居群的多态性位点比率(60.66%)低于其它两个居群,华山峪居群为最高(95.08%)。黄埔峪居群的遗传多样性与其他两个居群的遗传多样性之所以表现出差异,主要表现为遗传多样性降低,一方面是因为黄埔峪峪道深邃,与华山峪邻接的一侧多为悬崖峭壁,使得该居群与其他两个居群之间基因交流的机会非常小,另一方面是因为近年来该山峪成为进山乘坐上山缆车的必经之路,修筑公路及人为的破坏,使黄埔峪中华山新麦草的生境破坏或逐渐丧失,居群密度降低,通过风力传播到此地的种子找到适宜生境得以存活的几率也很小,观察发现此处生长的华山新麦草籽粒常常干瘪甚至仅有空壳,居群内个体可能主要以营养繁殖(根状茎)为主,从而导致居群遗传变异性下降。根据研究结果,华山新麦草自然居群的多态位点比率(95.08%)大于所有植物居群的平均值(34%)^[16],与远交种相比,也较远交种的平均值大(51%)^[17]。在以往禾本科植物的研究中,多态位点比率也多大于 51%,如野生二粒小麦(*Triticum dicoccoides*)的多态位点比率为 81.4%^[18],大麦(*Hordeum vulgare*)为 63%^[19],蒙古冰草(*Agropyron mongolicum*)为 80.2%^[20],羊草(*Leymus chinensis*)高达 96.1%^[21]。说明华山新麦草稀有的原因并非是遗传多样性的缺乏,这与以前的研究结果一致^[12]。此外,华山新麦草 RAPD 分析结果中的多态位点

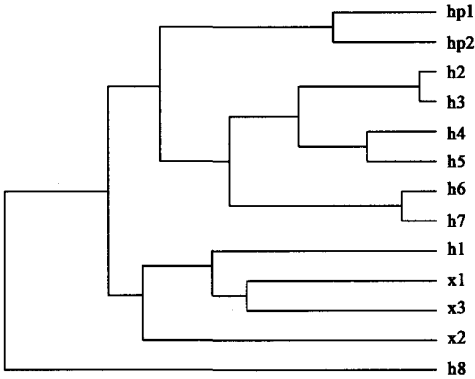


图 3 华山新麦草 13 个亚居群 Nei 遗传距离的聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis of thirteen subpopulations of *P. huashanica* based on Nei's genetic distance

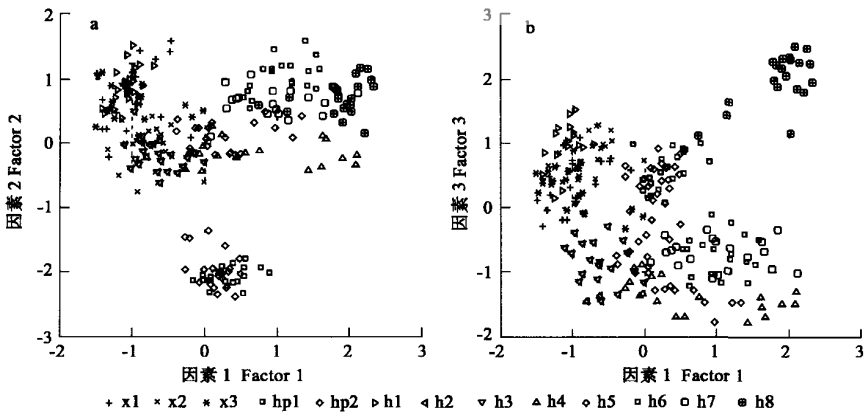


图 4 华山新麦草亚居群个体 PCA 分析中的 X-Y(a)与 X-Z(b)二维分布图

Fig. 4 The 2D[X-Y (a) and X-Z (b)] distribution of PCA analysis of total individuals of thirteen subpopulations of *P. huashanica*

比率高于等位酶分析结果(69%)^[12],与野生二粒小麦的研究相一致^[18]。

3.2 华山新麦草自然居群的遗传结构和分化

通过对华山新麦草居群遗传结构的分析,结果显示遗传变异大部分来自亚居群之内(67.47%),少部分存在于亚居群之间(32.63%)。遗传变异在华山新麦草 3 个山峪的表现不同,黄埔峪居群的 Shannon 多样性指数(0.3262)和基因分化系数(0.1006)在 3 个山峪为最低,说明黄埔峪的两个亚居群之间有较高的相似性。华山峪居群最高(分别为 0.4644 和 0.2986),华山峪为 3 个山峪中最大的一个山峪,华山新麦草在华山峪中从入口处(海拔为 460m)到最高峰南峰(海拔 2160m)都有分布,且自然环境复杂,这就使得华山峪各亚居群之间存在较大的变异性。

华山新麦草聚类分析的树状图显示,13 个亚居群 266 个个体明显聚为 4 支:黄埔峪两个亚居群单独聚为一支,表明黄埔峪的华山新麦草已成为一个相对独立的居群。华山峪低海拔亚居群与仙峪亚居群之间的海拔差异不大,低海拔的华山新麦草分布在开放的峪口处,多生长在路边,与仙峪地理位置相连,物候期接近,基因交流的机会比较大,在聚类图上显示有交错现象。除华山峪高海拔的一个亚居群(h8)单独成为一支外,华山峪其它亚居群成为一支,其中较高海拔的亚居群(h6 和 h7)单独成为一支,较低海拔的亚居群(h2, h3, h4 和 h5)成为一支。可以看出海拔高度是华山新麦草亚居群分化的原因之一。海拔梯度是一种环境梯度,海拔每升高 100m,温度平均下降约 0.55℃,温度的降低会引起物候期的推迟^[17]。此外,环境的改变可能也影响植物的生活史特征,如延迟开花和缩短其生长发育期。根据 2002 年 5 月对华山新麦草传粉物候期的观察,华山峪玉泉院低海拔处(460m)的华山新麦草籽粒已近黄熟期,而仙女峰(940m)、青柯坪(960m)的华山新麦草正处在盛花期,东峰(1900m)阳光充足的地方华山新麦草正在抽穗,尚未开花,南峰(2160m)的华山新麦草处在孕穗期,花序还未抽出。以往的研究也表明海拔每升高 200m,传粉物候期就推迟 1~3d,海拔差异超过 500m 的亚居群,传粉物候期不相互重叠^[23]。这显然限制了低海拔亚居群和高海拔亚居群间的基因流,进而导致华山峪亚居群的遗传分化。华山新麦草自然居群的基因流水平较低, $Nm=1.0322$,与等位酶的研究结果基本一致($Nm=2.77$)^[22],均低于一般风媒传粉植物($Nm=5.24$)^[23],暗示华山新麦草自然居群的基因流正处在一种临界状态:有分化的潜能,但受多种因素(如居群有效大小、密度、亚居群间的地理距离等)的共同影响^[12]。另一方面,华山新麦草赖以生存的华山是由 7 万 a 前的燕山期地壳构造运动产生的花岗岩柱侵入体,在内外应力的作用下,山体强烈上升,崛地而起,形成了沟壑深邃,山势兀立的特殊的中高山地貌景观,很小的面积就可有极悬殊的地势高差造就了垂直分带明显的森林植被。华山峪及其东侧的黄埔峪和西侧的仙峪峪道两侧多为悬崖,岩石节理发育,岩体破碎,又受地震活动影响而山崩现象严重,大小岩块混杂,多无土或土层甚薄,仅在较缓的山坡或低凹的地方才有稍厚的土层,华山新麦草正是生长在这样的生境中。因此,有时看似两个相邻的亚居群,由于其所处的特殊的环境而基因达不到交流。

References:

- [1] Instituto Botanico Boreali-occidentali Academiae Sinicae. *Flora tsinlingensis*. Beijing: Chinese Scientific Press, 1976, 1(1): 99.
- [2] Lu B R. Diversity and Conservation of the Triticeae Genetic resources. *Chinese Biodiversity*, 1995, 3(2): 63~68.
- [3] Chen S Y, Zhang A J, Fu J. Hybridization Between Wheat and *Psathyrostachys huashanica*. *Acta Genetica Sinica*, 1991, 18(6): 508~512.
- [4] Sun G L, Yan J, Yang J L. Production and Cytogenetic Study of Intergenetic Hybrid between *Triticum aestivum* and *Psathyrostachys huashanica*. *Acta Genetica Sinica*, 1992, 19(4): 322~326.
- [5] Ding C B, Zhou Y H. Fertilization and Embryo Development in Hybridization Between Wheat and *Psathyrostachys huashanica*. *J. Sichuan Agric. Univ.*, 1997, 15(1): 18~20.
- [6] Hou W S, Zhang A J, Yang Q H, et al. Breeding and Cytogenetic study of *Triticum aestivum*-*Psathyrostachys huashanica* alien substitution Lines. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*, 1997, 17(3): 368~373.
- [7] Zhang H Q, Zhou Y H, Zheng Y L, et al. Morphology and cytology of intergeneric hybrids between *Hystrix duthiei* ssp. *longearistata* and *Psathyrostachys huashanica* (Poaceae: Triticeae). *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2002, 40(5): 421~427.
- [8] The Compiling Team of Situation Research Report on the Biodiversity in China. *The situation research report on the biodiversity in China*. Beijing: Chinese Environment Science Press, 1998. 372.
- [9] The Compiling Team of Final Report of Protection Plan on the Biodiversity in China. *The protection plan of Chinese biodiversity*. Beijing: Chinese Environment Science Press, 1994. 92.
- [10] Chinese National Forest Bureau and Agriculture Ministry. The list of Chinese urgently protected wild plants (The first group). *Plant Journal*, 1999, 5:7.
- [11] Zhao L F, Li S, Pan Y, et al. Population differentiation of *Psathyrostachys huashanica* along an altitudinal gradient detected by random amplified polymorphic DNA. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*, 2001, 21(3): 391~400.

- [12] Liu Z L, Li S, Yan G Q, *et al.* Genetic Structure and Intraspecific Genetic polymorphisms in Natural Populations of *Psathyrostachys huashanica*. *Acta Genetica Sinica*, 2001, **28**(8): 769~777.
- [13] Yue M, Zhang L J, Ma K, *et al.* Endangering reason and reproductive strategy of *Psathyrostachys huashanica* Population. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, **21**(8): 1314~1320.
- [14] Wang G L, Fang H J. *Plant gene engineering principles and techniques*. Beijing: Science and Technology Press, 1998. 370~375.
- [15] Yeh F C, Yang R C. *POPGENE v 1. 31*. University of Albert and Center for International Research, 1999.
- [16] Hamrick J L, Godt M J. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, Clegg M T, Kaher A L, *et al.* *Plant population genetics, breeding and germplasm resources*. Sinauer, Sunderland, 1989. 43~63.
- [17] Ozenda P. La Végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen. Masson, France, 1985.
- [18] Fahima T, Sun G L, Beharav A, *et al.* RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theor. Appl. Genet.*, 1999, **98**: 434~447.
- [19] Fernández M E, Figueiras A M, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with know origin. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, **104**: 845~851.
- [20] Xie X M, Yun J F, Yin J. RAPD analysis of genetic diversity of *Agropyron mongolicum*. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*, 2002, **22**(1): 56~62.
- [21] Cui J Z, Zu Y G, Zheng X D. Genetic differentiation in *Leymus chinensis* populations revealed by RAPD markers: variation on the frequencies of amplified fragments. *Bulletin of Botanical Research*, 2001, **21**(2): 272~277.
- [22] Liu Z L, Song Y, Li S, *et al.* Pollination phenology and an indirect estimate of gene flow in natural populations of *Psathyrostachys huashanica*. *Acta Phytocologica Sinica*, 2001, **25**(4): 426~430.
- [23] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman Broyles S L. Gene flow among plant populations: Evidence from genetic markers. In: Peter C H, Stephenson A G, eds. *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics*, Missouri Botanical Garden Press, 1995. 215~232.

参考文献:

- [1] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志. 北京: 科学出版社, 1976, **1**(1): 99.
- [2] 卢宝荣. 小麦族遗传资源的多样性及其保护. 生物多样性, 1995, **3**(2): 63~68.
- [3] 陈淑阳, 张安静, 傅杰. 普通小麦与华山新麦草的杂交. 遗传学报, 1991, **18**(6): 508~512.
- [4] 孙根楼, 颜济, 杨俊良. 普通小麦与新麦草属间杂种的产生及细胞遗传学研究. 遗传学报, 1992, **19**(4): 322~326.
- [5] 丁春邦, 周永红. 小麦与华山新麦草远缘杂交的受精和胚胎发育. 四川农业大学学报, 1997, **15**(1): 18~20.
- [6] 侯文胜, 张安静, 杨群慧, 等. 普通小麦-华山新麦草异代换系的选育及细胞遗传学研究. 西北植物学报, 1997, **17**(3): 368~373.
- [7] 张海琴, 周永红, 郑有良, 等. 长芒猴草与华山新麦草属间杂种的形态学和细胞学研究. 植物分类学报, 2002, **40**(5): 421~427.
- [8] 中国生物多样性国情研究报告编写组. 中国生物多样性国情研究报告. 北京: 中国环境科学出版社, 1998. 372.
- [9] 中国生物多样性保护行动计划总报告编写组. 中国生物多样性保护行动计划. 北京: 中国环境科学出版社, 1994. 92.
- [10] 中国国家林业局, 农业部. 国家重点保护野生植物名录(第一批). 植物杂志, 1999, **5**: 7.
- [11] 赵利峰, 李珊, 潘莹, 等. 华山新麦草自然居群沿海拔梯度的遗传分化. 西北植物学报, 2001, **21**(3): 391~400.
- [12] 刘占林, 李珊, 阎桂琴, 等. 华山新麦草自然居群的遗传结构和种内遗传多态性研究. 遗传学报, 2001, **28**(8): 769~777.
- [13] 岳明, 张林静, 马凯, 等. 华山新麦草濒危原因及种群繁殖对策. 生态学报, 2001, **21**(8): 1314~1320.
- [14] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学技术出版社, 1998. 370~375.
- [20] 解新明, 云锦凤. 蒙古冰草遗传多样性的 RAPD 分析. 西北植物学报, 2002, **22**(1): 56~62.
- [21] 崔继哲, 祖元刚, 郑晓铎. 羊草种群遗传分化的 RAPD 分析: 扩增片段频率的变化. 植物研究, 2001, **21**(2): 272~277.
- [22] 刘占林, 宋颐, 李珊, 等. 华山新麦草开花物候期观测和自然种群基因流的间接估测. 植物生态学报, 2001, **25**(4): 426~430.