

## 青藏高原东部矮生嵩草遗传多样性的 RAPD 研究

赵庆芳<sup>1,2</sup>, 李巧峡<sup>1</sup>, 马世荣<sup>1</sup>, 崔燕<sup>1</sup>, 王刚<sup>2</sup>

(1. 西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070; 2. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

**摘要:** 基于随机扩增多态 DNA (RAPD) 方法分析了青藏高原东部矮生嵩草 (*Kobresia humilis*) 8 个居群的遗传多样性及分化程度。14 条随机引物共扩增出 194 个位点数, 其中多态性片段 168 个。研究表明, 矮生嵩草无论是在物种水平 (多态条带比率 *PPB* (%) 为 86.60%, Nei's 基因多样性 (*h*) 为 0.2622, Shannon's 信息指数 (*I*) 为 0.3983), 还是在居群水平 (*PPB* = 62.65%, *h* = 0.2126, *I* = 0.3185), 都具有较高的遗传多样性, 居群的遗传多样性大小与生境有相关性。而且, 用 SPSS 分析得出, 8 个居群的遗传多样性大小与海拔没有明显相关性。用 AMOVA 数据表明矮生嵩草的遗传变异主要分布在居群内 (83.04%), 居群间变异较小 (16.96%)。遗传分化指数  $G_{st}$  也显示了相似的结果 (0.1891)。从矮生嵩草 8 个居群的遗传距离和聚类分析发现, 以及用 NTSYS 对矮生嵩草 8 个居群的遗传距离矩阵与地理距离矩阵间的关系进行 Mantel 检测, 其结果表明各居群间的遗传距离与地理距离之间没有明显相关性 ( $r = 0.37779$ ,  $p = 0.9718 > 0.05$ )。

**关键词:** RAPD; 遗传多样性; 矮生嵩草

**文章编号:** 1000-0933(2006)08-2494-08 **中图分类号:** Q948 **文献标识码:** A

RAPD analysis of genetic diversity of *Kobresia humilis* along the eastern of Qinghai-Tibet Plateau of China

ZHAO Qing-Fang<sup>1,2</sup>, LI Qiao-Xia<sup>1</sup>, MA Shi-Rong<sup>1</sup>, CUI Yan<sup>1</sup>, WANG Gang<sup>2</sup> (1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China; 2. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(8): 2494 ~ 2501.

**Abstract:** *Kobresia humilis* is a very important fine pasture and ecological grass in the Qinghai-Tibet Plateau. In present study, the genetic diversity of *K. humilis* collected from eastern of the Qinghai-Tibet plateau in China, were investigated using RAPD markers. 194 loci were identified with 14 oligonucleotide primers, out of which 168 loci were polymorphic. *K. humilis* showed high genetic diversity: The percentage polymorphic loci (*PPB*%) was 86.60%, Nei's gene diversity (*h*) was 0.2622 and Shannon's information index (*I*) was 0.3983 at the species level; while the *PPB*% was 62.65%, *h* was 0.2126 and *I* was 0.3185, at the level of population. Moreover, the results showed that there was a relationship between the habitats and genetic diversity of *K. humilis*, but no correlation between the altitude and genetic diversity. AMOVA showed that most of the genetic variability (83.04%) resided among individuals within populations, whereas only 16.96% resided among populations. The  $G_{st}$ -values (0.1891) showed the similar result. Additionally, Nei's unbiased genetic distance matrix compared with a corresponding geographic distance matrix showed the two matrices were not significantly correlated ( $r = 0.37779$ ,  $p = 0.9718 > 0.05$ ).

**Key words:** RAPD; genetic diversity; *Kobresia humilis*

矮生嵩草 (*Kobresia humilis* (C. A. Mey. ex Trautv.) Sergiev) 属寒冷中生型多年生、莎草科嵩草属草本植物,

**基金项目:** 兰州大学干旱农业生态教育部重点实验室基金资助项目

**收稿日期:** 2004-11-01; **修订日期:** 2005-12-10

**作者简介:** 赵庆芳 (1962 ~ ), 女, 山东莱芜市人, 副教授, 主要从事植物生理生态及生态遗传学研究. E-mail: zhaqingfang2001@yahoo.com.cn

**致谢:** 感谢美国 Michigan 州大学植物生物学系植物生物学家 Eric W. Linton 对英文摘要的润色

**Foundation item:** The project was supported by Key Laboratory of Arid Agroecology of Lanzhou University

**Received date:** 2004-11-01; **Accepted date:** 2005-12-10

**Biography:** ZHAO Qing-Fang, Associate professor, mainly engaged in plant ecophysiology and ecological genetics. E-mail: zhaqingfang2001@yahoo.com.cn

广布于青藏高原,是青藏高原高寒草甸植物群落建群种之一。它具有草质柔软、营养丰富等特点,为各类家畜所喜食,是构成青藏高原的主要生态草种<sup>[1]</sup>,它的良好生长对维持青藏高原的生态平衡起着重要作用<sup>[1]</sup>。而且青藏高原又是特殊生境的典型代表,独特的高寒生态环境因素对于嵩草植物在发生、演化、适应和发展等生命活动过程的影响是极其深刻的<sup>[2]</sup>。因此,以青藏高原分布较广的高寒草甸主要建群种矮生嵩草(*Kobresia humilis*)为研究对象,运用 RAPD 分子标记对矮生嵩草的遗传多样性和居群遗传结构进行研究,旨在探讨在青藏高原高寒生态条件下,矮生嵩草的遗传背景及居群遗传变异在时空中的分布式样。除此之外,虽然邓自发等人<sup>[3]</sup>研究表明,矮生嵩草的繁育系统是以无性繁殖为主,有性繁殖为辅,但对于其基础的交配系统还不确切,所以本论文通过对其遗传多样性和遗传结构分析来研究矮生嵩草确切的交配系统。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

矮生嵩草密丛状,株高 3~15cm,叶短于秆,下部对折,上部平张,宽 1~2mm,边缘稍粗糙;穗状花序椭圆形或长圆形,小坚果倒卵形或倒卵状椭圆形,顶端骤缩成短喙,成熟时暗灰色。着生土壤为高山草甸土,较疏松,水分适中。矮生嵩草的群落结构简单,仅草本层一层;外貌整齐,呈黄绿色。常见的伴生种类有线叶嵩草(*Kobresia capillifolia*)、喜马拉雅嵩草(*Kobresia royleana*)、异针茅(*Stipa aliena*)以及杂类草圆穗蓼(*Polygonum sphaerostachyum*)、珠芽蓼(*Polygonum viviparum*)、高山唐松草(*Thalictrum alpinum*)、矮火绒草(*Leontopodium nanum*)、独一味(*Lamiophlomis rotata*)、雪白委陵菜(*Potentilla nivea*)、二裂委陵菜(*Potentilla biforca*)、高山银莲花(*Anemone demissa*)、假全叶银莲化(*Anemone pseudoholophylla*)、毛茛(*Ranunculus* sp.)、鳞叶龙胆(*Gentiana squarrosa*)等<sup>[4]</sup>。于 2003 年 7 月和 8 月,采集了分布于青藏高原东部的矮生嵩草(*K. humilis*)8 个居群 161 个个体。采用居群取样的方法,随机采取 18~22 个不同克隆系的新鲜叶片,分别用变色硅胶或吸水纸进行快速干燥,带回实验室,室温干燥保存待用。8 个居群具体的编号、采集地点、生态环境和海拔高度见表 1,不同居群大致的地理位置分布见图 1。

表 1 青藏高原东部矮生嵩草采样记录

Table 1 The sampling notes of *K. humilis* along the eastern of Qinghai-Tibet Plateau

居群编号 Population code	采样地点 Sampling site	生境 Habitats	地理位置 Geographical location	海拔高度 Altitude(m)	取样个体数 Sampling size
A1	甘肃合作 Hezuo, Gansu	林下滩地 Plain land under tree	34°54'N, 102°54'E	2850	20
A2	甘肃天祝 Tianzhu, Gansu	山地阴坡 shady slope	36°50'N, 103°11'E	2800	20
A3	甘肃天祝 Tianzhu, Gansu	山地阳坡 sunny slope	36°50'N, 103°12'E	2800	20
A4	四川红原 Hongyuan, Sichuan	滩地 Plain land	32°44'N, 102°46'E	3530	20
A5	四川红原 Hongyuan, Sichuan	山地阴坡 shady slope	32°43'N, 102°47'E	3600	22
A6	四川若尔盖 Ruergai, Sichuan	滩地 Plain land	33°32'N, 102°44'E	3450	18
A7	甘肃玛曲 Maqu, Gansu	山地阳坡 sunny slope	33°59'N, 102°2'E	3820	21
A8	青海海北站 Haibei, Qinghai	山丘顶部 hilltop	37°33'N, 101°18'E	3250	20

### 1.2 DNA 提取与检测

采用改进的 CTAB 法提取总 DNA<sup>[5]</sup>。提取的 DNA 加 200 $\mu$ l 1 $\times$  TE,在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中溶解。在含有 0.5 $\mu$ g/ml EB 的 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳检测各模板有无降解,并以  $\lambda$ DNA 为标准,电泳定量。

### 1.3 引物筛选

本研究所用引物购自上海生工公司,从 250 个 RAPD 随机引物中筛选出 14 条条带清晰、多态性高、反应稳定并且重复性好的引物进行扩增,引物编号见表 2。

### 1.4 RAPD-PCR

扩增反应在 Biometra UNO II PCR 仪上进行。PCR 运行程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;然后进入 40 个循环:94 $^{\circ}$ C 1min;37 $^{\circ}$ C 1min;72 $^{\circ}$ C 1min;循环完成后,72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。最后于 4 $^{\circ}$ C 保存。10 $\mu$ l 反应体系组成如下:50mmol/L Tris-HCl (pH = 8.3), 10% Ficoll, 1mmol/L Tartrazine, 500 $\mu$ g/ml BSA, 2mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ mol/L dNTP,

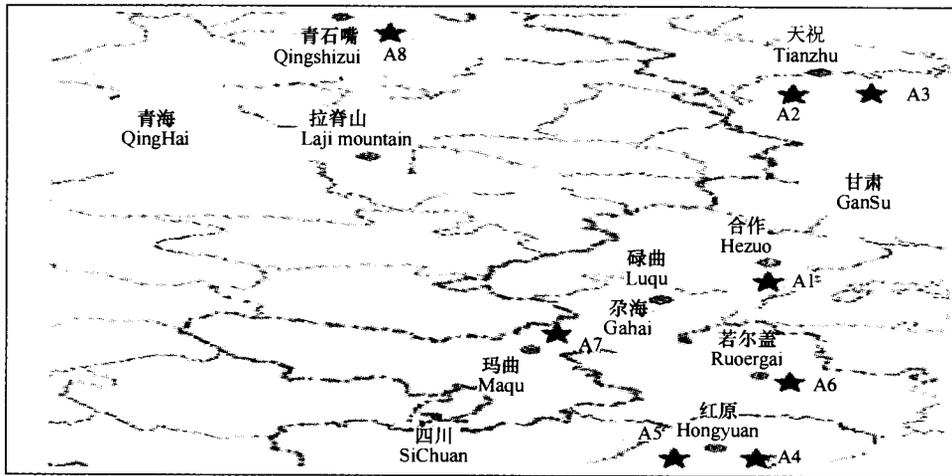


图1 矮生嵩草 8 个居群的地理位置图

Fig. 1 Localities of eight populations of *K. humilis*

1  $\mu\text{mol/L}$  of primer, 0.5 units TaqDNA polymerase 和 5-10ng 模板。扩增产物在含有 0.5  $\mu\text{g/ml}$  EB 的 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳 3.5 ~ 4h, 电泳介质用 TBE。使用 Uvi 凝胶图像分析系统成像, 使用 100 ~ 3000bp 分子量标记。

表 2 RAPD-PCR 反应的引物名称、扩增片段大小及其检测总位点数

Table 2 RAPD primer, band size and total loci					
引物 Primer	片段大小 Band size(bp)	扩增条带数 Amplified bands	引物 Primer	片段大小 Band size(bp)	总位点数 Total loci
S1270	2700-380	16	S209	2500-250	16
S1489	3500-200	13	S304	1800-130	15
S1515	1750-300	15	S306	1600-250	14
S1516	2000-300	10	S331	1500-200	17
S1519	2000-300	14	S372	1300-300	13
S186	2000-300	12	S377	1300-280	11
S2088	1031-250	11	S411	1800-180	17
总数 Total	3500-130	194	平均 Mean		13.9

## 1.5 数据分析

根据反应产物在电泳图中的位置,按条带的有无记为“1”或“0”,形成 RAPD 表型的 0/1 数据矩阵。用 POPGENE<sup>[6]</sup> 软件计算各居群的多态位点百分率 (PPB)、Shannon's 信息指数 ( $I$ ) 和 Nei's 基因多样性 ( $h$ ); 居群内遗传多样性 ( $H_s$ )、总的遗传多样性 ( $H_t$ )、基因分化系数 ( $G_{st}$ )、基因流估计值 ( $N_m$ ) 和 Nei's 遗传距离<sup>[7]</sup>。用 SPSS 软件分析遗传多样性大小与海拔的相关性。用 AMOVA 程序<sup>[8]</sup> 计算居群内和居群间的遗传变异。根据 Nei's 遗传距离用 NTSYS 对不同居群进行 UPGMA 聚类分析。同时用 NTSYS 对居群的遗传距离矩阵与地理距离矩阵间的关系进行 Mantel 检测。

## 2 实验结果

### 2.1 矮生嵩草的遗传多样性

用筛选的 14 条 RAPD 引物,对矮生嵩草的 8 个居群进行扩增,14 条引物扩增的多态条带比率 (PPB%)、Nei's 基因多样性 ( $h$ ) 和 Shannon's 信息指数 ( $I$ ) 见表 3。矮生嵩草 8 个居群总计 161 个个体,共检测到 194 条扩增条带,多态条带 168 条,所得片段的大小从 130bp 到 3500bp,平均每个引物扩增的位点数为 13.9 个 (表 2)。物种水平的多态条带比率 PPB (%) 为 86.60%, Nei's 基因多样性 ( $h$ ) 为 0.2622, Shannon's 信息指数 ( $I$ ) 为 0.3983。居群平均多样性水平的多态条带比率 PPB (%) 为 62.65%, Nei's 基因多样性 ( $h$ ) 为 0.2126, Shannon's 信息指数 ( $I$ ) 为 0.3185。8 个居群中以四川红原草滩生境居群 (A4) 的遗传多样性最高 (PPB = 65.98%,  $h$  =

0.2313,  $I = 0.3468$ ), 甘肃天祝山地阳坡居群(A3)的遗传多样性最低( $PPB = 57.73\%$ ,  $h = 0.1933$ ,  $I = 0.2917$ )。

表 3 矮生嵩草 8 个居群的遗传多样性

Table 3 The genetic diversity of eight population of *K. humilis*

居群 Population	取样个体 Sampling size	多态条带数 No. of polymorphic bands	多态条带比率 percentage of polymorphic loci PPB (%)	等位基因观察值 Observed number of alleles na	有效等位基因数 Effective number of alleles ne	Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity h	Shannon's 信息指数 Shannon's Information index I
A1	20	117	60.31	1.6031	1.3685	0.2141	0.3194
A2	20	123	63.40	1.6340	1.3625	0.2131	0.3208
A3	20	112	57.73	1.5773	1.3276	0.1933	0.2917
A4	20	128	65.98	1.6598	1.3924	0.2313	0.3468
A5	22	125	64.43	1.6443	1.3823	0.2232	0.3341
A6	18	119	61.34	1.6134	1.3832	0.2234	0.3326
A7	21	116	59.79	1.5979	1.3438	0.2024	0.3052
A8	20	113	58.25	1.5825	1.3375	0.2003	0.3021
平均 Mean	20.13	119.13	62.65	1.6615	1.3622	0.2126	0.3185
种类 Species	161	168	86.60	1.8660	1.4418	0.2622	0.3983
St. Dev				0.3416	0.3563	0.1824	0.2492

2.2 矮生嵩草遗传多样性大小与海拔的关系

采用 SPSS 分析了矮生嵩草 8 个居群遗传多样性大小与海拔的关系。SPSS 是基于 Shannon's 信息指数所做的统计,其结果表明矮生嵩草 8 个居群遗传多样性大小与海拔梯度没有明显相关性( $r = 0.369$ ,  $p = 0.369 > 0.05$ )(图 2)。

2.3 矮生嵩草的遗传结构

用 AMOVA 进行分子方差分析,显示矮生嵩草的遗传变异主要存在居群内(83.04%),居群间遗传变异较小(16.96%),具体见表 4。

用 POPGENE 在假设遗传平衡时,计算出矮生嵩草居群内遗传多样性( $H_s$ )为 0.2126;总的遗传多样性( $H_t$ )为 0.2622;基因分化系数( $G_{st}$ )为 18.91%;基因流估计值( $N_m$ )为 2.1445。

2.4 矮生嵩草居群间的遗传距离和聚类分析

矮生嵩草居群间的遗传一致性和遗传距离见表 5。在矮生嵩草的 8 个居群中,以天祝的两个居群 A2 和 A3 的遗传一致性最高(0.9792),遗传距离最近(0.0210);以合作居群 A1 与天祝居群 A3 的遗传一致性最低(0.9146),遗传距离最远(0.0892)。在聚类图中,A2 和 A3 聚为一支,A1 和 A7 聚为一支,A4、A6、A5 和 A8 聚为一支,具体见表 5 和图 1。

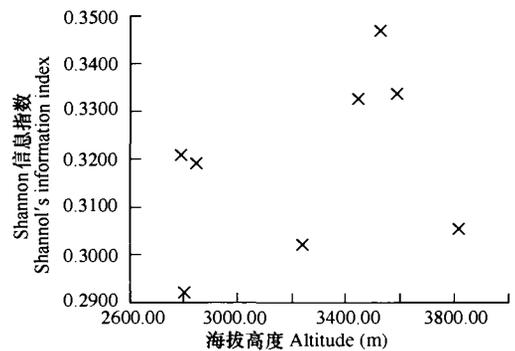


图 2 矮生嵩草 8 个居群的 Shannon's 信息指数(I)与海拔的相关性  
Fig.2 The analysis of correlation between genetic diversity and altitude for eight population of *K. humilis* based on shannon's information index (I)

表 4 矮生嵩草的 AMOVA 分析

Table 4 AMOVA analysing of *K. humilis*

变异来源 Source of variance	自由度 d.f	平方和 SSD	期望平均平方值 MSD	方差成分 Variance component	百分比 Percentage (%)	p 值 p value
居群间 Among populations	7	775.72	110.82	4.43	16.96%	< 0.0010
居群内 Within populations	153	3319.66	21.70	21.10	83.04%	< 0.0010

\* 1000 次显著性测试;d.f, 自由度;SSD, 平方和;MSD, 期望平均平方值;p (value), 缺失分布的可能性 No of permutations: 1000; d.f, degree of freedom; SSD, sum of squares; MSD, expected mean squares; p (value), probability of null distribution

表 5 矮生嵩草 8 个居群的遗传距离(对角线下)和遗传相似性(对角线上)

Table 5 Nei's genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among eight populations of *K. humilis*

居群 Population	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
A1	—	0.9244	0.9146	0.9401	0.9175	0.9495	0.9651	0.9327
A2	0.0786	—	0.9792	0.9219	0.9174	0.9248	0.9315	0.9195
A3	0.0892	0.0210	—	0.9202	0.9149	0.9213	0.9190	0.9166
A4	0.0618	0.0814	0.0831	—	0.9541	0.9598	0.9348	0.9441
A5	0.0861	0.0863	0.0890	0.0470	—	0.9433	0.9238	0.9599
A6	0.0519	0.0782	0.0820	0.0410	0.0584	—	0.9432	0.9430
A7	0.0355	0.0710	0.0844	0.0675	0.0792	0.0585	—	0.9329
A8	0.0697	0.0840	0.0871	0.0575	0.0409	0.0587	0.0695	—

2.5 居群间的遗传距离与地理距离的关系

用 NTSYS 对矮生嵩草 8 个居群的遗传距离矩阵与地理距离矩阵间的关系进行 Mantel 检测,其结果为

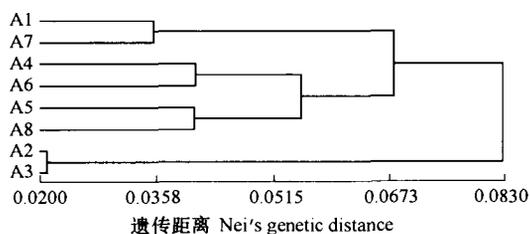


图 3 矮生嵩草 8 个居群 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类

Fig.3 UPGMA dendrogram for eight populations of *K. humilis* based on Nei's genetic distance

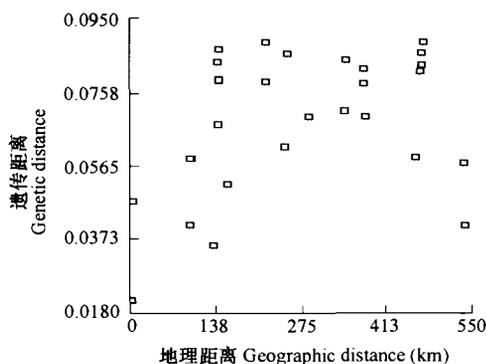


图 4 矮生嵩草居群间遗传距离与地理距离的相关关系

Fig.4 The correlation between genetic distance and geographic distance for eight populations of *K. humilis*

$r = 0.37779$ ,  $p = 0.9718 > 0.05$ (9999 次置换),说明各居群间的遗传距离与地理距离之间没有相关性。Mantel 检测得出的各居群间遗传距离和地理距离的相关关系见图 2。

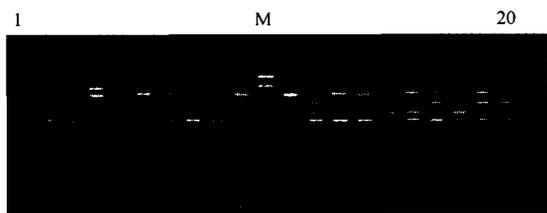


图 5 引物 S1489 对居群 A2(1~20 泳道)样品的扩增谱带

Fig.5 RAPD bands of A2 samples (lans 1~20) amplified with S1489  
M 为 DNA 分子量标量 Marker(100~3000bp) ladder(100~3000bp)

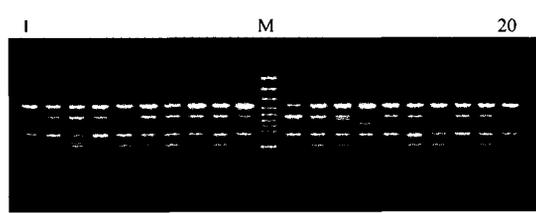


图 6 引物 S186 对居群 A3(1~20 泳道)样品的扩增谱带

Fig.6 RAPD bands of A3 samples (lans 1~20) amplified with S186  
M 为 DNA 分子量标量 Marker(100~3000bp) ladder(100~3000bp)

3 讨论

3.1 矮生嵩草遗传多样性

采用 3 种遗传多样性参数对矮生嵩草遗传状况进行了分析,包括多态条带比率(PPB%)、Shannon's 信息多样性指数(I)和 Nei's 基因多样性(h)。其中多态条带比率(PPB%)计算简单直观,在研究中得到广泛的应用<sup>[5,9,10]</sup>,但是它不能确定各条带频率变化,而且受到样本大小和条带总数的影响,只能是衡量居群遗传多样性的一个粗略估计值。在这种情况下,基于条带表型频率的 Shannon's 信息多样性指数(I)和基于 Hardy-Weinberg 假设的 Nei's 基因多样性(h),是更为可信的衡量指标<sup>[11]</sup>。

研究表明,对于植物物种水平和居群水平上的遗传多样性而言,多态条带比率(*PPB*)在 50% 左右被认为遗传多样性是丰富的<sup>[12-14]</sup>。矮生嵩草的 *PPB* 值无论是在物种水平上(*PPB* = 86.60%),还是在居群水平上(*PPB* = 62.65%)均较高。就 Nei's 基因多样性(*h*)来看,与用 RAPD 分析的其它植物<sup>[9,14]</sup>相比,矮生嵩草的 *h* 无论是在物种水平上(0.2622),还是在居群水平上(0.2126),均具有较高的遗传多样性。

作为青藏高原高寒草甸的主要建群种,矮生嵩草主要以地下短根茎进行营养繁殖<sup>[3]</sup>,野外研究发现和邓自发的研究表明<sup>[3]</sup>矮生嵩草产生种子的能力不小,但由于青藏高原恶劣的环境以及种皮坚硬等原因,最后能萌发为实生苗的种子比例较小。邓自发等<sup>[3]</sup>对海北站高寒草甸矮生嵩草种群繁殖对策的研究表明,通过营养繁殖矮生嵩草无性系种群每年新增个体数 711.34 个·m<sup>-2</sup>,种子萌发的实生苗数为 3.46 个·m<sup>-2</sup>,野外种子萌发率为 3%。有研究表明<sup>[15,16]</sup>,在一个居群内,比例非常低的实生苗的补充对于维持其高的遗传多样性是足够的。由此可见,对于多年生草本植物矮生嵩草,实生苗的不断补充是维持其遗传多样性的主要原因。所以在高寒生境中矮生嵩草的居群主要依靠营养繁殖来延续,而兼性的有性恢复系统尽管在矮生嵩草居群结构的建造上作用较小,但它在促进矮生嵩草的进化与适应上具有重要意义。

### 3.2 矮生嵩草遗传多样性的大小与海拔和生境的关系

有研究表明<sup>[17]</sup>,海拔越高的地方,由于传粉昆虫数量的减小和植物花期的减短,以及小居群效应的产生,某些种的有性繁殖会受到影响,克隆繁殖会随着海拔的升高而增加,居群内的遗传变异反而减少。本研究中,矮生嵩草 8 个居群遗传多样性的大小与海拔梯度无明显相关性( $r = 0.369, p = 0.369 > 0.05$ )(图 2)。如居群 A7 所处的海拔最高(3820m),但并未表现出最小的遗传多样性;A3 居群所处的海拔最低(2800m),反而表现出最小的遗传多样性;A4 居群所处的海拔较高(3530m),但具有最大的遗传多样性(表 3)。其原因是矮生嵩草在有性繁殖中主要为风媒传粉,另外矮生嵩草在长期的自然选择下,在垂直分布上有着广泛的生态适应,因此,在所研究的海拔高度范围之内(2800 ~ 3820m),矮生嵩草的遗传变异与海拔梯度没有明显相关性。

在所研究的矮生嵩草 8 个居群中,不同居群的遗传多样性与生境有相关性。大量资料表明<sup>[18-20]</sup>,植物居群遗传多样性的大小与生境有关。在 8 个居群中,A4(四川红原县草滩居群, *PPB* = 65.98%, *h* = 0.2313, *I* = 0.3468)、A5(四川红原阴坡居群, *PPB* = 64.43%, *h* = 0.2232, *I* = 0.3341)、A6(四川若尔盖县草滩居群, *PPB* = 61.34%, *h* = 0.2234, *I* = 0.3326)、A2(甘肃天祝阴坡居群, *PPB* = 63.40%, *h* = 0.2131, *I* = 0.3208)、A1(甘肃合作森林草滩居群, *PPB* = 60.31%, *h* = 0.2141, *I* = 0.3194) 5 个居群的遗传多样性参数无论是 *PPB* 指数,还是 *h* 和 *I* 指数均大于 A7(甘肃玛曲阳坡居群, *PPB* = 59.79%, *h* = 0.2024, *I* = 0.3052)、A8(青海海北站山顶, *PPB* = 58.25%, *h* = 0.2003, *I* = 0.3021)和 A3(甘肃天祝阳坡居群, *PPB* = 57.73%, *h* = 0.1933, *I* = 0.2917)3 个居群的遗传多样性参数,这说明处于山地阴坡和滩地生境居群的遗传多样性均高于山地阳坡居群的遗传多样性,其原因可能是处于阴坡及草滩生境的水分条件较阳坡的好,利于植物的生长及实生苗的建成。

### 3.3 矮生嵩草的遗传结构与交配系统分析

一个物种或群体的进化潜力,在很大程度上取决于它的居群遗传结构<sup>[21]</sup>,即遗传变异在空间的分布式样。确定一个物种的居群遗传结构,是了解其生物学属性,探讨物种进化过程和机制的重要一步<sup>[22]</sup>。基因分化系数(*Gst*)是衡量居群遗传分化最常用的指标,它表示在总的遗传变异中居群间变异所占的比例。一般情况下,对于濒危物种来说,居群间的遗传变异相对较大,分化明显,如中国疣粒野生稻<sup>[23]</sup>、银杉<sup>[24]</sup>等。植物的居群遗传结构受多种因素的影响,Hamrick & Godt<sup>[21]</sup>的研究表明,植物的繁育系统、基因流和种子扩散机制、繁殖方式及自然选择等因素对植物的遗传结构有明显的影响。Sagnard 等<sup>[18]</sup>认为,环境异质性对遗传结构也有一定的影响。

此外,也有很多学者利用遗传结构来研究植物的繁育系统<sup>[17,25,26]</sup>。如 Tomoshi 等人利用等位酶分析的遗传分化系数来推测 *Carex sociata* 的繁育系统,研究表明 *Carex sociata* 的遗传分化系数( $F_{st} = 0.737 \sim 1.000$ )很高,因而推测这种植物的繁育系统是以自交繁殖为主<sup>[25]</sup>。De pace 等人利用同工酶研究表明 *Dasypyrum villosum* 的遗传变异主要分布在居群内(90%),而居群间的遗传变异只占 10%,因此估计 *Dasypyrum villosum* 主

要是以远交为主的植物<sup>[26]</sup>。

本研究中, AMOVA 数据表明矮生嵩草的遗传变异主要分布于居群内(83.04%), 居群间变异较小(16.96%)。Gst 也显示了相似的结果。矮生嵩草的遗传分化系数  $G_{st}$ (0.1891), 小于单子叶植物的平均分化系数( $G_{st} = 0.231$ )和多年生草本植物的平均分化系数( $G_{st} = 0.233$ )<sup>[21]</sup>。对于矮生嵩草来说, 维持居群内较高的遗传变异与繁育系统有关。虽然矮生嵩草在每平方米种子的萌发率相对较低, 但邓自发等<sup>[3]</sup>的研究表明矮生嵩草产生种子的能力并不低, 在矮生嵩草枯黄期, 种子库每个体积单位(1m × 1m × 0.1m)中矮生嵩草种子有 483 粒。Hamrick<sup>[27]</sup>的统计表明, 居群间的多样性差异受繁育系统影响很大, 自交繁育的植物有 51% 的遗传变异存在于居群之间。Bussel<sup>[28]</sup>统计了用 RAPD 分析的 35 种植物, 其中 6 个自交植物的平均  $G_{st}$  为 0.625, 29 个远交植物的平均  $G_{st}$  为 0.193。因此从本实验结果得知, 矮生嵩草的有性繁殖符合远交植物的特点。另外矮生嵩草的基因流在很大程度上也减小了居群间的分化。矮生嵩草为风媒传粉植物, 青藏高原上的强风、多风在一定程度上会促进居群间基因的交流。矮生嵩草的基因流估计值  $Nm$ (2.1445) 大于 1, 一般情况下, 当  $Nm > 1$  时, 就能够有效阻止遗传漂变的发生及居群间的遗传分化<sup>[29]</sup>。

### 3.4 矮生嵩草 8 个居群的遗传距离与聚类分析

用 NTSYS 对矮生嵩草 8 个居群的遗传距离矩阵与地理距离矩阵间的关系进行 Mantel 检测, 其结果表明各居群间的遗传距离与地理距离之间没有相关性( $r = 0.37779$ ,  $p = 0.9718 > 0.01$ )。但基于 Nei 的遗传距离和遗传聚类图结果显示, 地理距离较近的某些居群的遗传相似性较大, 这与沙伟等人<sup>[30]</sup>的研究结果比较相似。如 A2 和 A3 居群同处于甘肃天祝县的抓喜手龙乡, 两居群只被金强河所分开, 具有最近的遗传距离, 聚为一支; A1 和 A7 分别位于甘肃甘南藏族自治州的合作和玛曲, 具有较近的遗传距离, 也聚为一支。同在四川阿坝藏族自治州的 A4(红原), A5(红原) 和 A6(若尔盖) 相比较也具有相近的遗传距离, 聚在同一分支内。所以在较近的地理区域内, 尤其在同一地区内, 由于环境条件及物候条件不会出现太大的变化, 自然选择压力趋于一致, 加之种子、花粉交流频繁, 在一定程度上增加了居群间的基因交流, 结果表现为矮生嵩草在较近距离内居群间的遗传分化相对较小。

### References:

- [ 1 ] Zhang J. The characteristics of reproductive growth of *Kobresia humilis* on alpine meadow. Seed, 2003, (2): 3 ~ 4.
- [ 2 ] Han F, Ben G Y Shi S B. Comparative study on the resistance *Kobresia humilis* grown at different altitudes in Qinghai-Xizang Plateau. Acta Ecologica Sinica, 1998, 18(6): 654 ~ 659.
- [ 3 ] Deng Z F, Xie X L, Zhou X M. Primary study on reproductive strategies of *Kobresia humilis* population in alpine meadow. Chinese Journal of Ecology, 2001, 20(6): 68 ~ 70.
- [ 4 ] Zhou X M. China Kobresia meadow. Beijing: Science Press, 2001. 40 ~ 62.
- [ 5 ] Li A, Ge S Genetic variation and clonal diversity of *Psamochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. Annals of Botany, 2001, 87: 585 ~ 590.
- [ 6 ] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, Ye Z H, Mao J X. POPGENE V1.31. 1997. <http://www.ualberta.ca/~fyeh>
- [ 7 ] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89: 583 ~ 590.
- [ 8 ] Excoffier L. Analysis of molecular variance(AMOVA). Version 1.5. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva. 1993.
- [ 9 ] Xie L, Li L Q, Zhang D M. Assessment of genetic variation and distribution pattern of *Thalictrum petaloideum* detected by RAPDs. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(2): 165 ~ 170.
- [ 10 ] Hu B Z, Liu D, Hu B F, et al. Random Amplified polymorphic DNA study of local breeds in *Chinese alfalfa*. Acta Phytocologica Sinica, 2000, 4(6): 697 ~ 701.
- [ 11 ] Qian W, Ge S. Analysis of population genetic structure by using dominant markers. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(3): 244 ~ 255.
- [ 12 ] Ma X J, Wang X Q, Xu Z X, et al. RAPD Variation within and among populations of *Ginseng cultivars*. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(6): 587 ~ 590.
- [ 13 ] Liu G H, Jia B L. The study of genetic diversity of *Ulmus pumila* var. *sabulosa*. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2003, 17(5): 123 ~ 128.
- [ 14 ] Sun K, Chen W, Ma R J. A study on the genetic diversity of subpopulations of *Aippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis* at Ziwuling. GanSu (J). Journal of Lanzhou University, 2004, 40(3): 72 ~ 75.

- [15] Soane I D, Watkinson A R. Clonal variation in population of *Ranunculus repens*. *New Phytologist*, 1979, 82:557 ~ 573.
- [16] Watkinson A R, Powell J C. Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant population—a computer simulation of *Ranunculus repens*. *Journal of Ecology*, 1993, 1:707 ~ 717.
- [17] Younga A G, Hill J H, Murray B G, *et al.* Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the subalpine forb *Rutidosia leirolepis* F. Muell. (Asteraceae). *Biological Conservation*, 2002, 106:71 ~ 78.
- [18] 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.
- [19] Xu L, Wang Y L, Wang X M, *et al.* Genetic structure of *Reaumuria soongorica* population in Fukang desert, Xinjing and its relationship with ecological factors. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(7):787 ~ 794.
- [20] Sagnard F, Barberot C, Fady B. Structure of genetic diversity in *Abies alba* Mill. from southwestern Alps: multivariate analysis of adaptive and non-adaptive traits for conservation in France. *Forest Ecology and Management*, 2002, 157:175 ~ 189.
- [21] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A. H. D., Clegg M. T., Kahler A. L., Weir BS eds. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1990. 43 ~ 63.
- [22] Loveless M D, Hamrick J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann Rev Ecol Syst*, 1984, 15:65 ~ 95.
- [23] Qian W, Ge S, Hong D Y. Assessment of genetic variation of *Oryzagranelata detetced* by RAPDs and ISSRs. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 2(7):741 ~ 750.
- [24] Wang X Q, Zou Y P, Zhang D M, *et al.* RAPD analysis of genetic diversity of *Cathaya argyrophylla*. *Science in China (Series C)*, 1996, 26(5):436 ~ 431.
- [25] Tomoshi O, Masatsuga Y, Takuji H. Aneuploidal population differentiation in *Carex sociata* Boott (Cyperaceae) of the Ryukyu Islands, Japan. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2000, 132: 337 ~ 358.
- [26] De pace C, Qualset C. O. Mating system and genetic differentiation in *Dasypyrum villosum* (Poaceae) in Italy. *Plant Systematics and Evolution (Historical Archive)*, 1995, 197:123 ~ 147.
- [27] Hamrick J L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: Urbanska, K ed, *Differentiation patterns in higher plants*. New York: Academic Press, 1987. 53 ~ 67.
- [28] Bussel J D. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst population of *Isotoma patraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, 1999, 8:775 ~ 789.
- [29] Slatkin M. Gene flow in natural populations. *Ann Rev Ecol Syst*, 1985, 16:393 ~ 430.
- [30] Sha W, Zhou F J, Zu Y G. Genetic variability and differentiation of *Ambrosia artemisiifolia* from Northeast China. *Bulletin of Botanical Research*, 1999, 19(4):452 ~ 456.

#### 参考文献:

- [1] 张静. 高寒草甸矮嵩草 (*Kobresia humilis*) 生殖生长特性观测. 种子, 2003, (2):3 ~ 4.
- [2] 韩发, 贲桂英, 师生波. 青藏高原不同海拔矮嵩草抗逆性的比较研究. 生态学报, 1998, 18(6):654 ~ 659.
- [3] 邓自发, 谢晓玲, 周兴民. 高寒草甸矮生嵩草种群繁殖对策的研究. 生态学杂志, 2001, 20(6):68 ~ 70.
- [4] 周兴民. 中国嵩草草甸. 北京: 科学出版社, 2001, 40 ~ 62.
- [10] 胡宝忠, 刘娣, 胡国富, 等. 中国紫花苜蓿地方品种随机扩增多态 DNA 的研究. 植物生态学报, 2000, 24(6):697 ~ 701.
- [11] 钱韦, 葛颂. 居群遗传结构研究中显性标记数据分析方法初探. 遗传学报, 2001, 28(3):244 ~ 255.
- [12] 马小军, 汪小全, 徐昭玺, 等. 人参不同栽培群体遗传关系的 RAPD 分析. 植物学报, 2000, 42(6):587 ~ 590.
- [13] 刘果厚, 贾宝丽. 浑善达克沙地榆遗传多样性的研究. 干旱区资源与环境, 2003, 17(5):123 ~ 128.
- [14] 孙坤, 陈纹, 马瑞君, 等. 子午岭中国沙棘亚居群的遗传多样性研究. 兰州大学学报, 2004, 40(3):72 ~ 75.
- [18] 刘惠芬, 高玉葆, 王丹, 等. 内蒙古典型草原羊草种群遗传分化的 RAPD 分析. 生态学报, 2004, 24(3): 423 ~ 431.
- [23] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野水稻的遗传多样性. 植物学报, 2000, 42(7):741 ~ 750.
- [24] 汪小全, 邹喻萍, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. 中国科学(C 辑), 1996, 26(5):436 ~ 431.
- [30] 沙伟, 周福军, 祖元刚. 东北地区豚草种群的遗传变异和遗传分化. 植物研究, 1999, 19(4):452 ~ 456.