

不同放牧压力下大针茅种群的遗传多样性

珊 丹¹, 赵萌莉^{1,*}, 韩 冰², 韩国栋¹

(1. 内蒙古农业大学生态环境学院, 2. 内蒙古农业大学生物工程学院, 呼和浩特 010018)

摘要:大针茅是亚洲中部草原亚区特有的蒙古草原种, 以大针茅建群的草原在内蒙古的分布面积为 2 798 081 hm²。从遗传多样性上探讨了大针茅种群在放牧压力下的适应机制, 结果表明: 虽然放牧导致部分基因位点丢失, 但整个种群仍表现出丰富的多态性, ISSR 检测的多态性条带比率为 89 %。Nei's 指数计算的大针茅种群间的遗传分化为 0.1984, 说明有 19.8 % 的遗传变异存在于种群之间, 80.2 % 的遗传变异存在于种群内。由 Shannon's 和 Nei's 多样性指数检测的大针茅种群内遗传多样性随着放牧压力的增加有逐渐减弱的趋势。根据遗传距离构建的 UPGMA 聚类图中, 中度和重度放牧样地首先聚为一类, 不放牧和轻度放牧样地聚为一类, 随后聚在一起。

关键词:放牧; 大针茅; 遗传多样性; ISSR

文章编号: 1000-0933(2006)10-3175-09 中图分类号: Q143, Q943 文献标识码: A

Genetic diversity of *Stipa grandis* under different grazing pressures

SHAN Dan¹, ZHAO Meng-Li^{1,*}, HAN Bing², HAN Guo-Dong¹ (1. College of Ecology and Environmental Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. College of Bioengineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(10): 3175~3183.

Abstract: The area of the *Stipa grandis* steppe in Inner Mongolia is 2798081 hm². Based on the genetic variation, the adaptability of *Stipa grandis* under grazing pressure was significant. Changes to genetic diversity of the *Stipa grandis* population under different grazing pressures were studied by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR). The plant materials were collected from a series of grazing gradients of the *Stipa grandis* steppe in Dalinuoer national nature reserve in Inner Mongolia. The location of the reserve is 116°38'~116°41' E and 43°25'~43°27' N, and it has abundant vegetation types; *Leymus chinensis* is the constructive species. Dominant species include *Stipa grandis*, *Cleistogenes squarrosa*, *Artemisia frigida*, with the companion species being *Potentilla acaulis*. Four grazing gradients were identified, from herdsman residence to enclosure site according to the grazing pressure. They were no grazing (CK enclosure site), light grazing (LG), moderate grazing (MG) and heavy grazing (HG). Young leaves of each *Stipa grandis* were collected during the growing season.

The results showed that *Stipa grandis* has abundant genetic diversity although some polymorphic loci were missing. At the same time new polymorphic loci emerged when grazing pressure increased. 10 primers were used, with 74 bands produced in total and 65 of the bands being polymorphic. The total percentage of polymorphism was 89 %. With the increase of grazing pressures, the percentage of polymorphic loci of the *Stipa grandis* population decreased. The percentage of polymorphic loci was 62.2 % in the no grazing (CK) population, 64.9 % in the light grazing (LG) population, 58.1 % in the moderate grazing (MG) population and 56.8 % in the heavy grazing (HG) population. The genetic diversity of the population from highest to lowest by the Shannon's

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30060015, 30440051, 30360022); 内蒙古自然科学基金资助项目(200508010407)

收稿日期:2005-12-24; **修订日期:**2006-07-28

作者简介:珊丹(1978~), 女, 蒙古族, 内蒙古赤峰市人, 博士生, 主要从事植物生态学研究。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: menglizhao@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30060015, 30440051, 30360022), Natural Science Foundation of Inner Mongolia (No. 200508010407)

Received date: 2005-12-24; **Accepted date:** 2006-07-28

Biography: SHAN Dan, Ph. D. candidate, mainly engaged in plant ecology.

information index is as follows: light grazing (0.3486), no grazing (0.3339), moderate grazing (0.3249) and heavy grazing (0.2735), with the same distributional pattern as the Nei's genetic diversity index. The test showed that as grazing pressures increased, the change of genetic diversity decreased. The genetic differentiation coefficient among the population (G_{st}) was 0.1984, which showed small partial genetic diversity (19.8%) present among populations. Gene flow (Nm^*) between primers varied from 0.9806 to 3.4463 and the mean Gene flow (Nm^*) was 2.0202. The UPGMA cluster figure that was constructed based on the genetic distance matrix showed four populations that became genetically closer at each step. The first group was the moderate grazing (MG) population and the heavy grazing (HG) population, group two consisted of the no grazing (CK) population and the light grazing (LG) population, then the two groups closed together.

Key words: grazing; *Stipa grandis*; genetic diversity; ISSR

放牧对植物的影响是多方面的,家畜的选择性采食和践踏作用对群落的组成、结构的影响很大。许多研究证明,随着放牧率的增加,高大或中等的禾本科牧草、适口性好的豆科牧草和不耐践踏的牧草在群落中的比例均下降^[1,2]。放牧采食和物理损伤使植物失去茎叶,叶面积指数降低,影响了植物碳水化合物化合物的供应,植物正常生长发育受到干扰^[3,4];另一方面,家畜的践踏使土壤理化性质发生改变,随着放牧强度的增加,土壤渗透性下降,容重增加^[5],有机质和 N、P、K、Ca、Mg 含量降低^[6],植物从土壤中获得营养物质相应减少。在放牧对植物遗传多样性产生影响的研究上,赵萌莉等^[7]发现,长期放牧压力下羊茅居群的遗传多样性水平并未降低,王静等^[8]在研究冷蒿种群中指出,随着放牧强度的增加冷蒿种群间遗传距离缓慢增加,种群间的一致度降低,冷蒿种群的遗传分化与放牧强度有关系。本研究利用 ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat)分子标记技术,对不同放牧压力的大针茅(*Stipa grandis*)种群遗传多样性进行检测,以了解 ISSR 在检测大针茅遗传多样性的效率和分辨力,探讨放牧干扰下大针茅种群的遗传结构和遗传多样性变化。

1 采样地概况及研究方法

1.1 采样地概况

采样地位于内蒙古自治区赤峰市克什克腾旗西部达里诺尔国家级自然保护区境内砬子山以东的天然草地(116°38'~116°41'E,43°25'~43°27'N),为典型草原,草地植物群落类型为羊草+大针茅+糙隐子草,植物种类丰富,建群种为羊草(*Leymus chinensis*),优势种为大针茅(*Stipa grandis*)、糙隐子草(*Cleistogenes squarrosa*),主要伴生种为冷蒿(*Artemisia frigida*)、星毛委陵菜(*Potentilla acaulis*)等。草原群落随放牧压力的变化,最明显地表现在居民点或家畜饮水点周围放牧压力较大,远离居民点或家畜饮水点的另一端放牧压力较轻,结果沿半径方向构成草原群落的不同放牧压梯度。按照李博退化草地分级方法^[9],将草地划分为轻度放牧样地(light grazing, LG)、中度放牧样地(moderate grazing, MG)、重度放牧样地(heavy grazing, HG)、以及不放牧的围封区为对照区,即不放牧(no grazing, CK)样地,各放牧压力样地的植物群落特征见表 1。

表 1 不同放牧压力样地植物群落特征

Table 1 Plant population characterizes under different grazing gradients

项目 Item	放牧压力 Grazing pressure			
	不放牧(CK) No grazing	轻牧(LG) Light grazing	中牧(MG) Moderate grazing	重牧(HG) Heavy grazing
群落建群种、优势种 Community constructive species and dominant species	羊草、大针茅 <i>Leymus chinensis</i> + <i>Stipa grandis</i>	羊草、糙隐子草 <i>Leymus chinensis</i> + <i>Cleistogenes squarrosa</i>	糙隐子草、冷蒿 <i>Cleistogenes squarrosa</i> + <i>Artemisia frigida</i>	星毛委陵菜、冷蒿 <i>Potentilla acaulis</i> + <i>Artemisia frigida</i>
多年生牧草种数 Number of perennial species	42	41	29	21
1、2 年生植物种数 Number of annual species	8	11	12	13
植被盖度 Vegetation cover (%)	77	60	38	32
高度 Vegetation height (cm)	38	29	21	16
8 月份产草量(干量 g/m ²) Dry weight in August (g/m ²)	264.7	173.5	145.6	127.3

采样时,以居民点一端为起点至不放牧的对照区,设置 3 条样带(样带长约 5000m),作为 3 次重复样带。

1.2 ISSR 分析

1.2.1 叶片采集与处理 用于 ISSR 分析的叶片于大针茅生长旺盛时期(8 月初)按株随机采样,株距 50m 以上,每个样地分别采集 20 株,洗净阴干备用。

1.2.2 DNA 的提取与检测 采用 CTAB 法,从植物叶片中提取基因组 DNA,主要提取试剂配方参见文献^[10,11]。提取后的 DNA 沉淀用真空浓缩仪抽干,回溶,置于 4℃恒温箱备用。

将提取的 DNA 样品用紫外分光光度计(DU-T 型)和电泳-EB 染色的荧光强度测定 DNA 浓度,用已知浓度的λDNA 对照,确定 DNA 含量和分子量。

1.2.3 PCR 反应条件与反应体系建立 PCR 反应体系的建立主要通过对 DNA 浓度、引物等条件进行初步的调整,达到了反应条件的优化,确定了 ISSR-PCR 扩增反应总体积为 25μl 反应体系^[12]:其中包括 10×buffer 2.5μl,2.0 mmol/L MgCl₂ 2μl,0.1 mmol/L dNTPs,0.15μmol/L ISSR 引物,40ng 左右的基因组 DNA,1 单位 TaqDNA 聚合酶,灭菌三蒸水补齐至 25μl。

扩增程序:94℃预变性 3 min,94℃变性 1 min,54℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,进行 45 个循环,最后 72℃补平 5 min,4℃停止。扩增产物用 2.8% 琼脂糖凝胶(内含溴化乙锭)电泳鉴定,电泳 1.5~2.0 h 后,将凝胶放在自动凝胶成像系统下进行分析。

1.2.4 ISSR 引物筛选 以不放牧样地(CK)的大针茅为材料,对 32 个 ISSR 引物进行筛选,筛选出 10 个引物用于 PCR 扩增。引物由上海生物工程公司合成,名称和序列见表 2。

表 2 ISSR 所用引物序号与序列

Table 2 Sequence of the primers used to produce ISSR markers

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')
22893	GGAGAGGAGAGGACA	31674	GAGAGAGAGAGAGAGG
22895	ACACACACACACACC	31675	GAGAGAGAGAGAGAAAT
31669	ACACACACACACACTG	31676	ACACACACACACACYG
31672	AGA GAGAGAGAGAGAC	36541	AGA GAGAGAGAGAGGYC
31673	GAGAGAGAGAGAGAC	36543	GACAGACA GACAGACA

$Y = (C, T)$

1.2.5 谱带统计与数据分析 ISSR 多样性表型带计数:同一引物的扩增产物在电泳中迁移率相同的条带被认为是同源性的,属于同一位点的条带将清晰可见的强带和反复出现的弱带记为“1”,否则记为“0”,形成二元统计数据。

数据统计分析方法:应用 Popgen32 软件对大针茅种间遗传结构进行分析,计算以下遗传参数^[13,14]:多态位点比率(P)、Shannon's 表型信息指数(I)、Nei's 基因多样性指数(H)、群体分化系数(G_{st});根据 Nei's 遗传距离用类平均聚类方法(UPGMA)进行系统聚类,分析群体间遗传分化关系。

(1) 多态位点比率(P) $P = \text{具有的多态位点数} / \text{检测到的位点数}$

(2) Shannon's 信息指数计算的种群的遗传多样性指数与遗传分化系数,公式如下:

各种群的遗传多样性指数 $H_o = - \sum p_i \ln p_i$

总种群遗传多样性指数 $H_{sp} = - \sum p_i \ln p_i$

各种群平均遗传多样性指数 $H_{pop} = 1/n \sum H_o$

式中, p_i 为某条扩增带在某种群内出现的频率; p_i 为某条扩增带在总种群中出现的频率; n 为种群数目。由此计算遗传多样性在种群内所占比例: H_{pop} / H_{sp} ,在种群间所占的比例: $(H_{sp} - H_{pop}) / H_{sp}$ 。

(3) Nei's 遗传多样性指数将总种群的基因多样性(H_T)分解为种群内基因多样性(H_S)和种群间基因多样性(D_{ST}),并计算种群的遗传分化系数(G_{ST}):

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

$$H_S = 1 - J_s = 1 - (\sum J_i)/S$$

式中, S 为种群的数目, $J_i = (\sum X_{ik}^2)/n$, 这里 J_i 是第 i 个种群内的基因一致性, X_{ik} 是第 i 个种群第 k 个等位基因的频率。

$$H_T = 1 - J_T = 1 - (\sum Xk^2)/n$$

式中, $Xk = \sum W_i K_i K$, W_i 是第 i 种群的加权 ($\sum W_i = 1$)。

$$D_{ST} = H_T - H_S \text{ 或 } D_{ST} = (\sum \sum Dij)/S^2$$

式中, $D_{ij} = (J_i + J_j)/2 - J$, 其中的 J_{ij} 是第 i 个种群和第 j 个种群间的基因一致性, $J = \sum X_i K X_j K$ 。由此计算种群的遗传分化系数:

$$G_{ST} = D_{ST}/H_T$$

2 结果与分析

2.1 遗传多态性分析

本实验中,PCR 反应扩增的 DNA 片断大小一般在 300~1500bp 之间(图 1)。各引物检出的位点总数和单态位点及多态位点不同,其中 31672 引物检出的位点数最多,31675 和 36543 引物检出的最少,10 个 ISSR 引物在 44 份材料间共扩增出 74 条带,65 条为多态,多态性条带比率为 89%(表 3),说明供试材料基因组多态性较丰富;其中轻度放牧样地的大针茅种群多态性最高为 64.9%,其次是不放牧样地(62.2%),中度放牧和重度放牧下的大针茅种群多态性相对较低,分别为 58.1%和 56.8%,这一结果表现出单态位点随着放牧压力增加而增大,而多态位点相应减少的趋势。

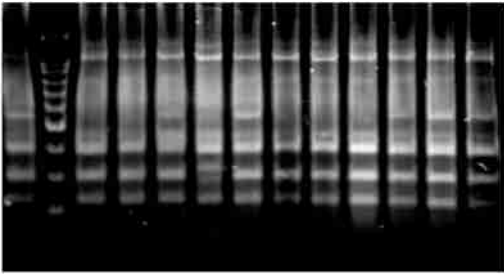


图 1 引物 31672 在大针茅种群上的扩增谱带
Fig. 1 Amplified bands of primer 31672 on *Stipa grandis* populations marker 右侧为轻度放牧种群 light grazing population is on the right

表 3 ISSR 引物扩增条带数

Table 3 Number of amplification markers generated with 10 ISSR primers in the test of 4 populations

引物序号 No. of primers	总扩增带数 Total bands	多态性带数 Polymorphic bands				
		总计 Total	不放牧(CK)	轻度放牧(LG)	中度放牧(MG)	重度放牧(HG)
22893	9	9	6	8	6	4
22895	9	7	6	4	3	2
31669	8	7	5	4	5	5
31672	10	7	4	5	3	6
31673	7	5	5	4	4	3
31674	6	5	2	2	5	4
31675	5	5	5	3	4	4
31676	6	6	5	5	5	5
36541	9	9	6	7	6	7
36543	5	5	2	5	3	2
合计 Total	74	65	46	48	43	42
比率 Percentage (%)		89.0	62.2	64.9	58.1	56.8

2.2 基因频率变化

由于各放牧压力种群所处的地理自然环境相同并未产生隔离,仍存在基因交流,因此 4 个不同放牧条件

下的大针茅种群的 ISSR 谱间有着大量共同的扩增片段,但也存在差异片段。在放牧压力下 4 个种群在基因频率上发生了显著的改变,虽然在各种群中并没有特异性的引物,但表现出明显的位点特异性。随着放牧压力的增大,一些位点基因频率减少,甚至消失。31669-2、31669-3、36541-3,在轻度放牧后即消失,重度放牧时位点 22893-1、22895-4、31673-6 消失;同时随着放牧压力的增加又有新的位点出现(31676-5、22895-9、31672-6、22895-3),或者是基因频率增加。

2.3 Shannon's 信息指数和 Nei's 指数估计的遗传变异

利用 Shannon's 信息指数,根据每个引物在不同种群扩增的 ISSR 表型结果的差异和出现的频率不同,计算大针茅种群遗传多样性。由表 4 可以看出,同一引物在不同种群中估计的遗传多样性指数不同;不同引物在同一种群内所估算的数值也不相同。其中,引物 36543 在轻度放牧种群中估测的数值最高,为 0.5056;引物 22895 在重度放牧种群中估测的数值最低,为 0.0865。Shannon's 指数估计的 4 个大针茅种群内的遗传多样性由大到小的顺序为轻度放牧样地(0.3486) > 不放牧样地(0.3339) > 中度放牧样地(0.3249) > 重度放牧样地(0.2735),说明过度放牧使大针茅种群遗传多样性降低。Nei's 遗传多样性指数估计的各个引物在 4 个大针茅种群内的遗传多样性(表 4)检测中,引物 36543 在轻度放牧种群中估测的数值也是最高的,为 0.3306;引物 31672 在中度放牧种群中估测的数值最低,为 0.1157。遗传多样性在轻度放牧样地最高(0.2314),重度放牧样地最低(0.1761),按遗传多样性的大小排列各种群顺序为:轻度放牧样地(0.2314) > 不放牧样地(0.2224) > 中度放牧样地(0.2184) > 重度放牧样地(0.1761),这与 Shannon's 多样性指数检测的遗传多样性顺序一致。

表 4 Shannon's 信息指数(*I*)、Nei's 指数(*H*)估计的 4 个大针茅种群内的遗传多样性
Table 4 Genetic diversity of 4 populations estimated by Shannon's index and Nei's index

引物序号 No. of primers	大针茅种群 Population							
	不放牧(CK)		轻度放牧(LG)		中度放牧(MG)		重度放牧(HG)	
	Shannon's 信息指数(<i>I</i>)	Nei's 指数 (<i>H</i>)	Shannon's 信息指数(<i>I</i>)	Nei's 指数 (<i>H</i>)	Shannon's 信息指数(<i>I</i>)	Nei's 指数 (<i>H</i>)	Shannon's 信息指数(<i>I</i>)	Nei's 指数 (<i>H</i>)
22893	0.4128	0.2865	0.4163	0.2645	0.3661	0.2461	0.2786	0.1947
22895	0.3147	0.2020	0.2171	0.1433	0.1829	0.1212	0.0865	0.0514
31669	0.3175	0.2108	0.2908	0.1984	0.3077	0.2025	0.3643	0.2479
31672	0.2335	0.1587	0.1974	0.1190	0.1683	0.1157	0.2109	0.1223
31673	0.4000	0.2692	0.2968	0.1936	0.3033	0.2031	0.1950	0.1228
31674	0.2185	0.1543	0.2975	0.2039	0.4813	0.3251	0.3236	0.2094
31675	0.4426	0.2777	0.4000	0.2843	0.3545	0.2248	0.3478	0.2182
31676	0.3744	0.2369	0.4496	0.2975	0.4008	0.2755	0.4273	0.2810
36541	0.3701	0.2498	0.4154	0.2792	0.3047	0.2057	0.2682	0.1543
36543	0.2550	0.1785	0.5056	0.3306	0.3794	0.2645	0.2326	0.1587
平均值 Mean	0.3339	0.2224	0.3486	0.2314	0.3249	0.2184	0.2735	0.1761

根据表 5,Shannon's 信息指数估计的种群内、种群间遗传多样性及分化中,引物 31676 估算的种群内遗传多样性(*H_{pop}*)最高(0.4130),引物 22895 估算的最低,为 0.2003,10 个引物估算的种群内遗传多样性平均是 0.3202;种内总的遗传多样性(*H_s*)的平均值为 0.4726。Shannon's 信息指数计算的遗传多样性在种群间所占比例从 19.2%(引物 36541)到 55.8%(引物 22895),种群间遗传分化的平均值为 32.2%,说明放牧干扰对大针茅种群的分化程度影响很大。

2.4 遗传结构与基因流

植物的基因型在种群内和种群间一般不是随机分布的,在不同种群之间,同一种群的不同亚种群之间,甚至在同一个个体的不同后代之间都存在显著的遗传差异。根据表 6,Nei's 遗传多样性指数计算的大针茅种内总遗传多样性的平均值为 0.3123,种群内遗传多样性平均是 0.2367,种群间的遗传分化为 19.8%,说明有 19.8%的遗传变异存在于种群之间,80.2%的遗传变异存在于种群内。不同引物所占的比例不同,其中引物

22893 最高为 33.8 % ,引物 31669 仅为 12.5 %。

表 5 Shannon 's 多样性指数估计的种群内、种群间遗传多样性及分化

Table 5 Partitioning of the genetic diversity of 4 populations by Shannon 's diversity index

引物序号 No. of primers	种群内遗传多样性 <i>H</i> _{pop}	种内总遗传多样性 <i>H</i> _s	种群内遗传多样性 (%) <i>H</i> _{pop} / <i>H</i> _s	种群间遗传多样性 (%) (<i>H</i> _s - <i>H</i> _{pop}) / <i>H</i> _s
22893	0.3685	0.5734	64.26	35.74
22895	0.2003	0.4531	44.21	55.79
31669	0.3201	0.4355	73.50	26.50
31672	0.2025	0.3573	56.68	43.32
31673	0.2988	0.4952	60.33	39.67
31674	0.3302	0.5455	60.54	39.46
31675	0.3862	0.4836	79.86	20.14
31676	0.4130	0.5352	77.17	22.83
36541	0.3396	0.4204	80.78	19.22
36543	0.3432	0.4271	80.34	19.66
平均值 Mean	0.3202	0.4726	67.77	32.23

许多因子(如种群大小、繁殖系统、性比、世代长短、世代重叠和基因流等)影响着自然植物种群的遗传变异程度,其中关键因子之一是基因流,即种群间和种群内基因的流动。植物种群内和种群间的基因流是借助于花粉、种子、孢子、植株个体以及其他携有种群遗传物质的物体为媒介进行的,其中花粉扩散是自然植物种群最主要的基因流,种群内基因流强度因物种而异,同时与种群密度、开花、物候的时间变异及繁殖系统有关。*N_m* 作为居群每代迁移数(the number of migrants per generation)可以通过 *G_{st}* 或 *G_{cs}* 测定基因流($N_m = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$)。表 6 中,各个引物的 *N_m* 值差异较大,从 0.9806 到 3.4463 不等,平均为 2.0202。Wright^[15] 认为,当 *N_m* > 1 时,基因流就可以防止遗传漂变引起的居群间的遗传分化,如果 *N_m* < 1 则由于遗传漂变可以导致种群间明显的遗传分化。因此,当 *N_m* 值升高时,*G_{st}* 值就降低。放牧压力下 4 个大针茅种群的基因流的存在说明种群间有基因的交流,且遗传分化不是由遗传漂变产生的。通过对大针茅种群生长环境的分析研究,不同放牧压力下大针茅种群相似的基因频率主要是由于相同的生境选择压力所引起的。

表 6 Nei 's 指数估计的种群内、种群间遗传多样性及分化

Table 6 Genetic diversity and variation between and within 4 populations by Nei 's index

引物 Primer	种内总遗传多样性 <i>H_t</i>	种群内遗传多样性 <i>H_s</i>	种群内遗传多样性比 (%) <i>H_s</i> / <i>H_t</i>	种群分化 (%) <i>G_{st}</i>	<i>N_m</i> *
22893	0.3912	0.2480	66.23	33.77	0.9806
22895	0.2981	0.1665	68.09	31.91	1.0669
31669	0.2854	0.2456	87.47	12.53	3.4904
31672	0.2227	0.1842	86.66	13.32	3.2538
31673	0.3227	0.2760	87.33	12.67	3.4463
31674	0.3634	0.2678	76.22	23.79	1.6017
31675	0.3306	0.2512	82.22	17.78	2.3121
31676	0.3678	0.2727	77.63	22.36	1.7361
36541	0.2692	0.2222	85.62	14.37	2.9795
36543	0.2715	0.2331	85.84	15.94	2.6368
平均 Mean	0.3123	0.2367	80.33	19.84	2.0202

N_m = estimate of gene flow from *G_{st}* or *G_{cs}*. E. g. , $N_m = 0.5(1 - G_{st}) / G_{st}$

2.5 种群间遗传距离

遗传距离是评价种群内和种群间遗传变异水平的重要指标,遗传距离越大,说明亲缘关系越远;遗传距离越小,亲缘关系越近。根据 10 个引物 ISSR 扩增产物的电泳结果,按 Nei 's 遗传多样性指数的方法计算出 4 个不同放牧强度大针茅种群的遗传距离和遗传相似度中(表 7),无放牧样地与轻度放牧样地间的遗传距离最近(0.0817),说明放牧对这两个样地的影响在遗传多样性水平上很接近;随着放牧强度的增加,遗传距离缓慢增

加,无放牧样地与重度放牧样地间遗传距离最远为 0.1627,这两个种群间的差异较大,表明放牧对大针茅种群的遗传多样性有一定的影响,但是在较小的时间和空间尺度范围这种影响还很有限。

根据遗传距离所构建的 UPGMA 聚类图中,大针茅 4 个种群随着牧压的增加,逐步聚在一起,首先重度放牧样地和中度放牧样地聚为一类,其次不放牧样地和轻度放牧样地聚在一起,最后聚为一大类。

3 讨论

生物个体的表型(外部形态、细胞解剖结构、生理特性和生态习性等)是由基因型决定的,同时在一定程度上又受环境条件的影响。表型是基因型和环境之间相互作用的结果,基因型和环境对表型的作用是相互的,但总是一起发生作用。有时相同的形态可能涉及到不同的基因型;同一种基因型在不同的环境条件下也可发育出不同的形态和生理特征。因此,个体的变异总是基于 3 个因素:环境饰变、遗传重组和突变^[16]。目前,国内外对放牧适应性的研究主要集中在形态、生理、遗传 3 个水平上,虽然途径和组织水平不同,但实质上三者相互联系、相互作用。植物种群遗传变异水平和遗传结构与其适应性和进化潜力密切相关。个体的遗传变异、种群的遗传分化保证了植物对异质环境的适应,有利于种群的生存繁衍。

大针茅是亚洲中部草原亚区特有的蒙古草原种,一般占据地带性生境,大面积出现于广阔、平坦而不受地下水影响的波状高平原,成为群落的建群种和优势种。广泛的分布面积使其面临各种各样的生存环境,庞大的个体数目,频繁的基因交流使大针茅维持了较高水平的遗传变异,产生新的遗传变异的机会也相对较多,这些都有利于增加遗传多样性水平。ISSR 标记检测出大针茅的多态位点百分率是 89%,高于高等植物平均遗传多样性水平(70%)^[17]。Grant 和 Millar 认为,一个物种的进化潜力和抵御不良环境的能力取决于遗传多样性水平的高低,高的遗传多样性水平是大针茅适应环境胁迫的基础,但是,这种适应能力并非能无限扩大,只是在一定范围内起作用。

张红梅^[18]在研究未放牧利用的种群和长期放牧后又围封的种群中发现,放牧压力使大针茅种群的少数位点缺失、突变,同时有新的位点出现,但种群间的遗传差异很小,放牧并未使大针茅种群产生遗传分化。本研究通过 ISSR 分子标记分析也表明不同放牧压力下,大针茅种群的 Shannon's 指数和 Nei's 指数的估算都显示出大量的分子变异存在于大针茅种群内部,少量(19.84%和 32.23%)存在于群体间,说明不同放牧压力下的 4 个种群具有很相似的基因频率,但是并非所有等位基因在不同的放牧样地均有分布,不放牧样地和重度放牧样地的大针茅种群都分别拥有特异的位点或等位基因,对于消失或基因频率降低的位点与放牧敏感型基因表达是否有关,以及新出现和基因频率增加的位点是否是耐牧基因表达的问题还需在以后的研究中进一步探讨。

植物种群遗传变异水平和遗传结构是其进化历史、分布范围、繁育方式、生活型等各种不同因素综合作用的结果,与其适应性和进化潜力密切相关。理论上,如果遗传变异丰富,种群在受到生境破坏、景观破碎化和环境压力下时,遗传多样性可通过物种对变化环境反应能力而有助于种群生长。遗传多样性的丧失降低了物种对付生物、非生物环境变化的能力,也降低了对付短时间内环境变化的能力,如病虫害、食草动物的采食等。ISSR 的结果分析中,由 Shannon's 信息指数估计的各个引物在 4 个大针茅种群内的遗传多样性的大小排列顺

表 7 Nei's 指数估测的各种群的遗传距离与遗传相似度
Table 7 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of four populations

大针茅种群 Population	大针茅种群 Population			
	无放牧 CK	轻度放牧 LG	中度放牧 MG	重度放牧 HG
无放牧 CK	—	0.9215	0.8943	0.8499
轻度放牧 LG	0.0817	—	0.9249	0.8628
中度放牧 MG	0.1117	0.0781	—	0.9281
重度放牧 HG	0.1627	0.1475	0.0746	—

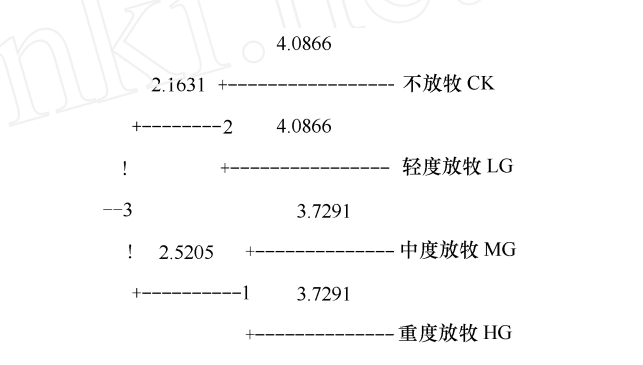


图 2 不同放牧压力大针茅种群 ISSR 分析的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA cluster figure of *S. grandis* population under different grazing pressures

序为:轻度放牧样地>不放牧样地>中度放牧样地>重度放牧样地,这与 Nei's 遗传多样性指数检测的遗传多样性顺序一致,说明随着放牧压力的增大,大针茅种群内的遗传多样性有逐渐减弱的趋势。随着放牧压力加大,大针茅的营养枝长度变短,小穗结实数减少使有性生殖能力降低,个体之间、种群之间基因交流减弱,因此大针茅种群的遗传多样性降低,出现衰退,甚至从草群中消失。研究中发现,轻度放牧大针茅种群的 Shannon's 信息指数和 Nei's 遗传多样性指数均比无放牧时高,这与韩冰^[19]研究的不同退化梯度克氏针茅遗传多样性的变化结果一致,这一结果说明适度的放牧可以使大针茅种群有较高的遗传多样性,适度的放牧对草原植被的生长是有益的。但是,多大的放牧强度和放牧率对大针茅种群的生长、繁殖及遗传多样性有利还需要进一步的研究分析。

根据多态位点百分率、Shannon's 信息指数、Nei's 多样性指数分析,ISSR 分子标记检测到丰富的遗传多样性,这与 ISSR 在对基因组进行扩增时,引物结合位置的不同有直接关系。ISSR 的引物中包含有一定长度的重复序列,与它结合的目标(多为微卫星)在 DNA 复制过程中存在滑动和不均匀交换等现象,使得它们在不同个体间的重复次数存在较大差异,因此,更易于导致引物结合位点和两个结合位点间的片段长度产生差异。RAPD 是以少数碱基组成的随机核苷酸序列为引物,每个 RAPD 片段的产生要求在可扩增范围内存在与引物匹配的反向互补序列,RAPD 的稳定性和重复性有着不容忽视的缺陷,筛选的带多为重复序列,且易产生非特异性带,具有明显的遗传背景特异性。Gilbert^[20]、Yang^[21]等的研究也都证明,比起利用随机引物对基因组进行扩增的 RAPD 来说,ISSR 检测遗传多态性的能力更高。同时,RAPD 和 ISSR 的实验过程和费用基本一致,在可以用琼脂糖电泳获得清晰条带而避免使用聚丙烯酰胺凝胶和放射自显影(或银染)的前提下,ISSR 标记获得单位引物多态位点比率的能力明显高于 RAPD。钱韦^[22]等采用 ISSR 和 RAPD 两种标记研究中国疣粒野生稻的遗传多样性证明了 ISSR 对 PCR 反应的敏感度低于 RAPD,稳定性高于 RAPD,且总体来说 ISSR 能检测到比 RAPD 更多的遗传变异。本实验中,ISSR 标记检测到的多态位点比率为 89.00%,高于张红梅^[26]采用 RAPD 方法统计的 7 个大针茅种群的遗传变异(居群水平平均多态位点比率为 61.88%),这一结果也说明,ISSR 分子标记在检测种群遗传多样性上是一种行之有效的方法。

4 结论

(1) 10 个 ISSR 引物在 44 份材料间共扩增出 74 条带,65 条为多态,多态性条带比率为 89%,说明供试材料基因组多态性较丰富;随着放牧压力变化,一些位点消失,同时有新的位点出现。

(2) 由 Shannon's 信息指数和 Nei's 遗传多样性指数检测的遗传多样性由大到小的顺序为:轻度放牧样地>无放牧样地>中度放牧样地>重度放牧样地,即随着放牧压力的增大,大针茅种群内的遗传多样性有逐渐减小的趋势。

(3) 根据遗传距离构建的 UPGMA 聚类图中,中度放牧和重度放牧样地首先聚为一类,不放牧和轻度放牧样地聚为一类,随后聚在一起,表明大针茅种群在放牧压力下出现一定的遗传分化。

References:

- [1] Wang D L, Lu X L, Luo W D. Analysis to effects of different grazing density on characteristics of rangeland vegetation. *Acta Pratacultural Science*, 1996, 5(3):28~33.
- [2] Laycock W A. Stable states and thresholds of range Condition on North American rangelands -a view -point. *J of Range Management*, 1991, 44(5):427~433.
- [3] Wang W, Liang C Z. Analysis of the plant individual behavior during the degradation and restoring succession in steppe community. *Acta Phytoecological Sinica*, 2000, 24(3):268~274.
- [4] Li Y H, Wang S P. Response of grassland plant to prataculture under grazing. In: *Study on Grassland Ecosystem*. No. 5, Beijing: Science Press, 1997. 23~31.
- [5] Holt J A, Bristow K L, McIvor J G. The effects of grazing pressure on soil animals and hydraulic properties of two soils in semi-arid tropical Queensland. *Australian J. of soil Research*, 1996, 34:69~79.
- [6] Guan S Y, Qi P Q, Kang S A, et al. Effect of grazing capacity on nutrient of steppe soil. In: *Study on Grassland Ecosystem*. No. 5, Beijing: Science

- Press,1997. 17~22.
- [7] Meng L, Willms W D, Han B, *et al.* Effect of heavy grazing pressure on the random amplified polymorphic DNA marker diversity of mountain rough fescue (*Festuca Campetris* Rybd.) in southwestern Alberta Canadian. *Journal of Plant Science*, 2005,85(3): 623~629.
- [8] Wang J, Yang C, Yin J, *et al.* Changes of the genetic diversity of *Aremisia frigida* population under the disturbance of grazing. *Acta Ecologica Sinica*, 2004,24(11):2465~2471.
- [9] Li B. Current condition, Problem and countermeasure of sustainable utilization of grassland resource in China. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 1997,(1):49~50.
- [10] Li D, Ling D H. Comparison of five methods of DNA extraction from *Pinus massoniana*. *Chinese Bulletin of Botany*, 2000, 17(2): 168~173.
- [11] Han B, Zhao M L, Zhang H M. Study on extraction method of genome DNA in *Stipa*. *Journal of Inner Mongola Institute of Agriculture and Animal Husbandry*, 2002,23(4):32~35.
- [12] King L M, Schaal B A. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution*, 1989, 43:1117~1119.
- [13] Chalmer 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.
- [14] Nei 's M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70:3321~3323.
- [15] Wright S. The genetical structure of population. *Ann Eugen*, 1951, 323~354.
- [16] Xu B S. Ecological variation within plant species. In:Chen J K, Yang J, eds. *Plant evolutionary biology*. Wuhan: Wuhan University Press, 1994. 103~127.
- [17] Zou Y P, Ge S, Wang X D. molecular markers in on system and evolutionary biology. Beijing: Science Press,2001.
- [18] Zhang H M, Zhao M L, Li Q F, *et al.* Detection of genetic diversity in *Stipa Grandis* on grazing pressure by using RAPD markers. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2005,19(5):185~189.
- [19] Han B. Population differentiation of *Stipa krylovii* and its ecological variation in deteriorated series. Doctor 's degree thesis. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University Press, 2003.
- [20] Gilbert J E, Lewis R V, Wilkinson M J. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1125~1131.
- [21] Yang W P, Oliverira A C, Godwin I. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in *Chinese sorghums*. *Crop Sci*, 1996, 36:1669~1676.
- [22] Qian W, Ge S, Hong D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs. *Acta Botanica Sinica*, 2000,42(7):741~750.

参考文献:

- [1] 王德利,吕新龙,罗卫东. 不同放牧密度对草原植被特征的影响分析. *草业学报*,1996,5(3):28~33.
- [3] 王炜,梁存柱. 草原群落退化与恢复演替中的植物个体行为分析. *植物生态学报*,2000,24(3):268~274.
- [4] 李永宏,汪诗平. 草原植物对家畜放牧的营养繁殖对策初探. 见:草原生态系统研究,第5集. 北京:科学出版社,1997. 23~31.
- [6] 关世英,齐沛钦,康师安,等. 不同牧压强度对草原土壤养分含量的影响初析. 见:草原生态系统研究,第5集. 北京:科学出版社,1997. 17~22.
- [8] 王静,杨持,尹俊,等. 冷蒿种群在放牧干扰下遗传多样性的变化. *生态学报*,2004,24(11):2465~2471.
- [9] 李博. 我国草地资源现状、问题及对策. *中国科学院院刊*,1997,(1):49~50.
- [10] 李丹,凌定厚. 五种提取马尾松基因组 DNA 方法的比较. *植物学通报*,2000,17(2):168~173.
- [11] 韩冰,赵萌莉,张红梅,等. 针茅属植物基因组 DNA 提取方法的研究. *内蒙古农业大学学报*, 2002, 23(4):32~35.
- [16] 徐炳声. 植物种内的生态变异,见:陈家宽,杨继主编,植物进化生物学. 武汉:武汉大学出版社,1994. 103~127.
- [17] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京:科学出版社,2001.
- [18] 张红梅,赵萌莉,李青丰,等. 放牧压力下大针茅种群遗传多样性的 RAPD 分析. *干旱区资源与环境*, 2005,19(5):185~189.
- [19] 韩冰. 克氏针茅种群分化及不同退化系列生态变异的研究. 博士学位论文. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2003.
- [22] 钱韦,葛颂,洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性. *植物学报*, 2000, 42(7):741~750.