

DOI: 10.5846/stxb201309272376

肖猛, 李群, 郭亮, 唐琳, 王丽, 陈放. 四川西部濒危植物桃儿七遗传多样性的 RAPD 分析. 生态学报, 2015, 35(5): 1488-1495.

Xiao M, Li Q, Guo L, Tang L, Wang L, Chen F. RAPD analysis of genetic diversity of an endangered species *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying from Western Sichuan Province, China. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1488-1495.

四川西部濒危植物桃儿七遗传多样性的 RAPD 分析

肖 猛^{1,2}, 李 群^{1,3}, 郭 亮¹, 唐 琳¹, 王 丽¹, 陈 放^{1,*}

1 四川大学生命科学学院, 成都 610064

2 四川旅游学院, 成都 610100

3 四川师范大学生命科学学院, 成都 610066

摘要: 桃儿七是一种具有重要药用价值的珍稀濒危植物。采用 RAPD 分子标记技术, 对在四川西部地区的桃儿七 7 个自然种群的遗传多样性水平和遗传结构进行了分析。用 12 个 RAPD 引物对 7 个种群共 140 个样品进行了扩增, 共得到 111 条清晰带, 其中 32 条具有多态性, 在物种水平上多态位点百分率 (PPB) 为 28.83%, 在种群内的多态位点百分率变动幅度为 4.50% 至 16.22%。同其它一些濒危植物相比, 桃儿七种群具有较低的遗传多样性 ($H_e = 0.0622$, $H_o = 0.0987$)。7 个自然种群间出现了很强的遗传分化, 分化指数接近 70%。种群间的基因流低 ($N_m = 0.2240$)。造成上述结果的可能原因是与桃儿七的繁育方式和有限的基因流等因素有关。应将遗传多样性相对较高的松潘县牟尼沟种群作为原位保护的核心种群进行保护, 尽量保护所有现有种群。

关键词: 桃儿七; RAPD; 遗传多样性; 遗传结构; 保护策略

RAPD analysis of genetic diversity of an endangered species *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying from Western Sichuan Province, China

XIAO Meng^{1,2}, LI Qun^{1,3}, GUO Liang¹, TANG Lin¹, WANG Li¹, CHEN Fang^{1,*}

1 College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

2 Sichuan Tourism University, Chengdu 610100, China

3 College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610066, China

Abstract: *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying is an important medicinal and endangered species. Recently, the size of the wild population of *S. hexandrum* in western Sichuan Province has been noted to be very low and declining rapidly. Analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers was conducted on seven natural populations of *S. hexandrum* in western Sichuan Province in order to investigate the genetic diversity and genetic structure of the populations. Leaf samples of 140 individuals from the seven populations were collected. Twelve RAPD primers were designed to generate highly reproducible and stable DNA fragments (the sizes of DNA bands ranged from 200 to 1500 bps). One hundred and eleven discernible DNA fragments were produced depending on these primers, and 32 fragments were polymorphic loci (mean 9.3 bands and 2.7 polymorphic bands per primer). The percentage of polymorphic bands (PPB) was 28.83% at the species level, and PPB within population ranged from 4.50% to 16.22% with an average of 10.30%. The result of POPGENE analysis indicated that the level of genetic variation of *S. hexandrum* ($H_e = 0.0622$, $H_o = 0.0987$) was lower than other endangered plants. At the species level, the average effective number of alleles per locus (A_e) was 1.1011. The average expected heterozygosity was estimated to be 0.0193 within populations (H_e) and 0.0622 at the species level (H_t).

基金项目: 国家科技部重点项目 (中国西南关键动植物保护工程)

收稿日期: 2013-09-27; **网络出版日期:** 2014-07-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chenfang@scu.edu.cn

Shannon's index (H_o) ranged from 0.0110 to 0.0587, with an average of 0.0269 at the population level (H_{pop}) and 0.0987 at the species level (H_{sp}). Among the seven populations investigated further, the MNG population revealed higher variability (PPB, 16.22%; A_e , 1.0569; H_e , 0.0362; H_o , 0.0587), whereas the MSG population had the lowest variability (PPB, 4.50%; A_e , 1.0105; H_e , 0.0065; H_o , 0.0110). As revealed by the AMOVA analysis, a high level of genetic differentiation among populations was detected, 68.74% of the genetic differentiation occurred between populations and 31.26% within populations. Gene flow ($N_m=0.4429$) was low between natural populations of *S. hexandrum* in the area. Nei's genetic identity (I) values varied from 0.9189 to 0.9883 between the pairs of populations; Populations DXB and YLG had the lowest (0.9189), whereas MNG and LHK had the highest (0.9883). The dendrogram was constructed by the UPGMA method using Nei's genetic distance values based on RAPD. Two clusters were defined among seven populations, no significant correlation was found between geographic distribution and the genetic distance on the UPGMA tree. The correlation coefficient ($r = 0.3747$; $P = 0.0350$) by Mantel test did not show any significant relationship between the matrices of geographical distances and pair-wise genetic distances based on RAPD. Species breeding system and limited gene flow among populations were plausible reasons for the high genetic differentiation observed in this species. On the basis of the genetic and ecological information, some appropriate strategies for conserving the endangered medicinal species in this region were proposed; namely, keeping a stable environment suitable for the breeding and growth of population, rescuing and conserving the core populations (such as MNG in Songpan County) for in situ conservation and also trying to protect all of the existing populations.

Key Words: *Sinopodophyllum hexandrum*; RAPD; genetic diversity; genetic structure; conservation strategy

桃儿七 (*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying; 分类学上的同种异名有 *S. emodi* (Wall) Ying, *Podophyllum hexandrum* Royle, *P. emodi* Wall; 又名西藏鬼臼) 是小檗科桃儿七属单一种的多年生草本植物^[1]。桃儿七主要生长在喜马拉雅及临近地区。在我国, 主要分布在海拔 2700 到 4500 m 的西藏、四川、云南等高山地区, 其他的省(自治区)如陕西、甘肃、青海、宁夏以及湖北亦有分布。据调查, 桃儿七在四川省主要分布于阿坝州、甘孜州以及凉山州木里县等地。桃儿七是一种传统的民间药用植物, 其根和根茎中的主要成分之一鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 是人工合成抗癌药物 (VP₁₆, 依托泊苷; VM₂₆, 替尼泊苷) 的前体^[2]。桃儿七也是一种叶奇、花美、果实具有多种用途的植物^[3]。近年来由于人类砍伐等干扰活动加剧, 桃儿七生境受到破坏, 加上根茎可入药, 采挖过量, 致使种群数量迅速减少, 已被国家列为珍稀濒危保护植物^[4]。因此, 很有必要进行桃儿七保护遗传学研究, 探讨它的濒危机制。有关桃儿七遗传多样性研究, 先前的工作仅在细胞学有关核型研究方面的报道^[5-6]。然而, 细胞学研究观察到的植物信息量非常有限, 要想更深入地了解桃儿七的遗传多样性, 必须对其进行更深层次 (如 DNA 水平) 的遗传多样性研究。目前, 这方面的研究在国内外仅见少量报道^[7-9]。

在研究植物多样性的众多分子标记技术中, RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 是应用最广泛的技术方法之一。RAPD 标记是以一段随机寡核苷酸序列为引物 (长度一般为 10 bp)、以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增的一种分子标记技术^[10]。该技术具有简单易行、不需要事先知道材料的基因信息、能够覆盖整个基因组以及显性遗传标记等特点, 且从理论上 RAPD 可提供的信息量是无限的。目前, RAPD 标记在重要作物林木遗传图谱构建、基因定位与分离、种质资源评估、栽培植物品种鉴定、野生植物天然种群的遗传结构分析以及种间或属间遗传关系分析等领域的研究已有大量报道^[11]。近年来, 应用 RAPD 技术在种群水平上进行濒危植物保护生物学的研究已取得显著的进展, 主要是揭示濒危物种的遗传多样性, 探讨濒危机理, 提出保护策略建议。目前在国内应用 RAPD 技术进行遗传多样性研究所涉及的濒危植物如长叶红砂 *Reaumuria trigyna*^[12]、崖柏 *Thuja sutchuenensis*^[13]、明党参 *Changium smyrnioides*^[14]、水杉 *Metasequoia glyptostroboides*^[15]、版纳青梅 *Vatica guangxiensis*^[16]、华木莲 *Sinomanglietia glauca*^[17]、闽楠 *Phoebe bournei*^[18]、银杉 *Cathaya*

argyrophylla^[19]、五针白皮松 *Pinus squamata*^[20] 等。本文选用了 RAPD 分子标记技术对川西高原地区桃儿七分布较多的 5 个地区 7 个野生种群的遗传多样性水平和遗传结构进行检测,旨在揭示桃儿七自然种群的遗传结构和遗传多样性水平,从分子水平上探讨它的濒危机制,为有效保护桃儿七遗传资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

根据四川大学植物标本馆的文献记载和野外实地调查桃儿七的分布情况,于 5 月下旬至 6 月下旬在桃儿七分布较多的四川省西部高原地区采集了 7 个种群(最远的两种群间直线距离为 567.5 km,最近的两种群距离为 12.5 km)、合计 140 份材料的样品。7 个种群在四川西部的分布见图 1。各种群所在地及生境状况见表 1。在每个桃儿七种群中随机选取 20 个具有代表性的样株,每个样株间隔距离 5 m 以上,每株采集的幼嫩叶片迅速装入自封袋中并用硅胶干燥保存,用于总基因组 DNA 的提取。

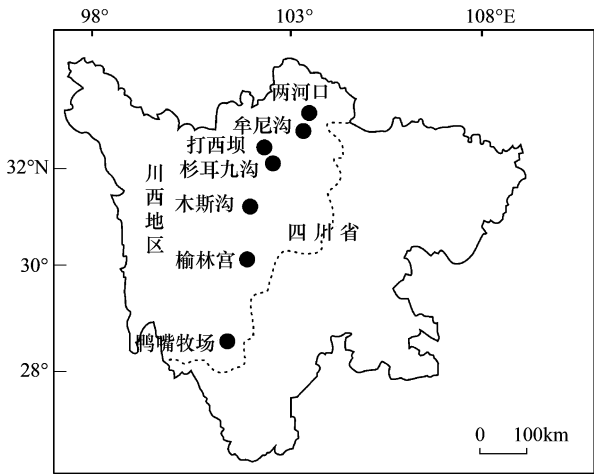


图 1 桃儿七 7 个自然种群的地理位置
Fig.1 Location of the seven natural population of *Sinopodophyllum hexandrum* included in this study

表 1 7 个种群桃儿七的产地、生境及采样个体数

Table 1 Location, habitat and sample size of seven of <i>Sinopodophyllum hexandrum</i> Populations				
种群分布 Location	样品采集地 Origin	海拔/m Altitude	生境 Habitat	采样数 Sample size (N)
两河口	松潘县两河口	3150	与野樱桃、黄连、高山柳、枸杞混生,林间阴湿,小片、零星生长在灌木下	20
牟尼沟	松潘县牟尼沟	3050	与柏树、松树、云杉、沙棘、杜鹃、高山柳混生,附近有小溪,小片生长在灌木下、斜草坡空地上	20
打西坝	红原县打西坝	3450	与沙棘、大黄、黄荆、高山柳、忍冬混生,土壤潮湿,小片生长在灌木下	20
杉耳九沟	红原县杉耳九沟	3350	与云杉、高山柏、落叶松、杜鹃、高山柳、绣线菊混生,附近有溪水山沟,零星生长在沟边、灌木下	20
木斯沟	金川县木斯沟	3150	与冷杉、云杉、白杨、高山柏、花椒、小叶青杠、马桑混生,林间阴湿,零星生长在林间水沟边、灌木下	20
榆林宫	康定县榆林宫	3000	与高山柳、多种灌木混生,土壤潮湿,小片、零星生长在灌木下、刺丛间	20
鸭嘴牧场	木里县鸭嘴牧场	3300	与冷杉、云杉、沙棘、杜鹃、高山柳、黄连、小叶青杠混生,光线较充足,附近有小溪,土壤湿润,小片生长在灌木下、石隙间、河滩空地	20

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与 RAPD 的 PCR 扩增

采用改进的改良 CTAB 法^[11]提取桃儿七基因组总 DNA。总 DNA 溶于 0.1×TE 缓冲液,分装后放入 -20 ℃ 储存或放入 4 ℃ 待用。采用来自 Operon 公司(且本实验室现有)及根据相关资料设计并由上海生工公司合成的 10 碱基 RAPD 引物(120 条),从中筛选出 12 条具多态性和稳定性的引物在 PTC-100TM 中进行扩增。在预实验的基础上经过比较和优化确定 20 μL 反应体系为:1×PCR buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.3, 50 mmol/L/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂),模板 10—30 ng、1 U Taq 聚合酶、0.4 mmol/L dNTPs、0.6 μmol/L 引物、37 ℃ 的退火温度、0.001% 的白明胶。PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min, 37 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 然后进行 40 个循环:94 ℃ 变性 1 min, 37 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 产物在含 0.5% EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶中以 $1\times$ TAE 缓冲液为介质电泳,以 100 bp Marker 作为标准分子量对照,在 Gene genius Bioimaging System 凝胶成像仪上照相。

1.2.2 统计分析

RAPD 扩增产物电泳图谱中的每一条带均视为一个分子标记(marker),代表一个引物的结合位点。按凝胶同一位置上 DNA 带的有无进行统计,有带(包括弱带)的记为“1”,无带的记为“0”的格式输入构成的 RAPD 表型数据矩阵用于分析。采用 POPGENE 1.31 软件对全部种群和各个单种群分别进行遗传参数分析^[21],分别计算了多态位点百分率(PPB)、观测等位遗传标记数(A_o)、有效等位遗传标记数(A_e)、种群总遗传多样性(H_t)、种群内遗传多样性(H_s)、各种群间的遗传分化指数(G_{st})、基因流(N_m)、Nei's 基因多样性(H_e)、Nei's 遗传一致度(I)和遗传距离(D)。Shannon's 信息指数(H_o)也被用来检测种群遗传多样性水平。 $H_o = -\sum P_i \log_2 P_i$, P_i 为第 i 条带的表型频率。根据 Nei's 遗传距离,按不加权重对算术平均法(UPGMA)建立系统聚类树枝状图。另外,分子方差分析方法(AMOVA)也被用来分析种群间和种群内的分子变异^[22]。

为了检测种群间遗传距离和地理距离的相关性,运用 TFGA1.3 程序软件^[23]进行了 Mantel 测试(计算了 5000 个置换)。

2 结果与分析

2.1 扩增的多态性

从 120 个引物中筛选出至少能扩增出 2 条及以上多态性带的 12 个 RAPD 引物对桃儿七 7 个种群的 140 植株个体的 DNA 样品进行了 PCR 扩增。不同引物扩增的多态位点数不等,形成了带型丰富、片断大小及其组合不同的电泳图谱(图 2)。

扩增片段长度约为 200—1500bp,平均每个引物可扩增出 9.3 条带,其中多态性带平均为 2.7 条(表 2),引物 Psh17 扩增的条带数最多(12 条)且多态性带数亦最多(4 条),引物 Psh7 和 Psh11 扩增的条带数最少(7 条)且多态性带数亦最少(2 条)。

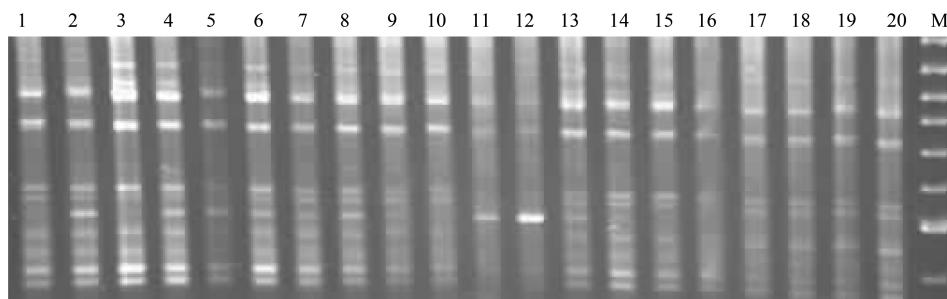


图 2 引物 Psh17 扩增牟尼沟(MNG)桃儿七种群的 RAPD 电泳图

Fig.2 RAPD profiles of MNG population of *S. hexandrum* with the primer Psh17

2.2 遗传多样性分析

用 POPGENE1.31 软件对桃儿七 7 个种群的遗传多样性进行统计分析,结果如表 3 所示。打西坝(DXB)、杉耳九沟(SEJG)、木斯沟(MSG)、两河口(LHK)、牟尼沟(MNG)、榆林宫(YLG)、鸭嘴牧场(YZMC)7 个种群的多态性位点百分率(PPB)分别为 11.71%、9.01%、4.50%、9.91%、16.22%、9.01%、11.71%。可见,牟尼沟(MNG)种群的多态位点百分率最高,木斯沟(MSG)种群的多态位点百分率最低。在种群水平上,7 个种群的多态位点百分率(PPB)平均为 10.30%;Nei's 遗传多样性(亦称期望杂合度, H_e)在 0.0065—0.0362 之间,平均值为 0.0193。Shannon's 信息指数(亦称香农指数)在 0.0110—0.0587 之间,平均值为 0.0269。各种群的 Shannon's 信息指数大小变化趋势与多态位点百分率一致。在物种水平上,其多态位点百分率、期望杂合度、Shannon 指数分别为 28.83%、0.0622、0.0987。RAPD 标记的遗传多样性分析表明桃儿七种群存在较低的遗传

多样性。

2.3 种群遗传结构分析

桃儿七种群总的遗传多样性 (H_t) 为 0.0622, 种群内的遗传多样性 (H_s) 为 0.0193, 表明总的遗传变异主要来自于种群间。根据总的遗传多样性和种群内遗传多样性计算不同种群间的分化水平 (G_{st}) 所分析的 7 个桃儿七种群间的 G_{st} 为 0.6906, 即表明总的遗传变异中有 69.06% 的变异存在于种群间, 种群内的遗传变异为 30.94%, 说明了种群间的分化水平非常高。种群间的基因流 (N_m) 为 0.2240。

利用分子方差变异分析 (AMOVA) 对 7 个桃儿七自然种群的遗传分化系数进行了分析, 结果表明: 总的遗传变异中有 68.74% 的变异发生在种群间, 有 31.26% 的变异发生在种群内, 种群间和种群内的变异均极显著 ($P < 0.002$) (表 4)。比较发现, AMOVA 分析所得结果与 Nei's 遗传多样性分化分析所得结果基本一致, 表明桃儿七种群间已出现了非常大程度的遗传分化。

表 2 引物及其序列和扩增结果

Table 2 List of primers, their sequences and amplification results

引物编号 Code of the primer	序列 (5'-3') Sequence 5'→3'	扩增条带数 No. amplified bands	多态性条带数 No. polymorphic bands
Psh 2	GTAACCTTGCT	10	3
Psh 4	CCGAATTCCC	9	3
Psh 5	CCGCAGAGC	9	2
Psh 7	GTTCCCTTGC	7	2
Psh 8	GGCAGGCTCG	10	4
Psh 9	GGACTCACA	12	3
Psh 10	CCACTCTCCA	8	2
Psh 11	TCTTCCGTCA	7	2
Psh 12	GGGCTTCCCT	8	2
Psh 14	CGAAGGACTA	11	3
Psh 15	CGACGTTGTA	8	2
Psh 17	GACGAGGTGC	12	4
总计 Total		111	32

表 3 RAPD 标记的桃儿七种群遗传多样性统计

Table 3 Statistical analysis of genetic variation of *S. hexandrum* populations by RAPD markers

种群分布 Location	多态位点百分率/% PPB, Percentage of polymorphic bands	观测等位基因数 A_o , Number of alleles per locus	有效等位基因数 A_e , Effective number of alleles per locus	期望杂合度 H_e , Gene diversity	香农指数 H_o , Shannon's information index
打西坝	11.71	1.1171	1.0322	0.0224	0.0370
杉耳九沟	9.01	1.0901	1.0282	0.0185	0.0303
木斯沟	4.50	1.0450	1.0105	0.0065	0.0110
两河口	9.91	1.0991	1.0274	0.0189	0.0320
牟尼沟	16.22	1.1622	1.0569	0.0362	0.0587
榆林宫	9.01	1.0225	1.0157	0.0266	0.0454
鸭嘴牧场	11.71	1.1171	1.0219	0.0166	0.0297
种群水平 Population level	10.30	1.1030	1.0285	0.0193	0.0269
物种水平 Species level	28.83	1.2883	1.1011	0.0622	0.0987

表 4 桃儿七种群间和种群内分子变异的 AMOVA 分析结果

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) within/among *S. hexandrum* populations as determined using RAPD markers

变异来源 Source of variation	自由度 df	总方差 Sum of squares	平均方差 Mean squares	变异组分 Variance component	总变异百分率 Total Variance/%	P
种群间 Among population	6	344.77	57.46	2.8092	68.74	<0.0002
种群内 Within population	133	169.90	1.28	1.2774	31.26	<0.0002

2.4 遗传距离和聚类分析

Nei's 遗传一致度和遗传距离的结果见表 5。桃儿七各种群间遗传一致度 (I) 值的变化范围为 0.9189—0.9883, 打西坝和榆林宫种群的遗传一致度最小 (一致度值为 0.9189), 两河口和牟尼沟种群遗传一致度最高 (0.9883); 桃儿七各种群间遗传距离值的变化范围为 0.0118—0.0845, 其中 DXB 和 YLG 的遗传距离最大

(0.0845), LHK 和 MNG 的遗传距离最小(0.0118)。对桃儿七 7 个种群的 Nei 遗传距离与地理距离进行了 Mantel 统计检验,结果表明,种群间的遗传距离和地理距离之间没有明显的相关性($r=0.3747, P=0.0350$),即遗传多样性的分布呈一定的地理趋势。

表 5 桃儿七 7 个种群间的 Nei's 遗传一致度(对角线上面)和遗传距离(对角线下面)

Table 5 Nei's original measures of genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among 7 *S. hexandrum* populations by RAPD markers

种群分布 Location	打西坝	杉耳九沟	木斯沟	两河口	牟尼沟	榆林宫	鸭嘴牧场
打西坝	—	0.9815	0.9691	0.9203	0.9334	0.9189	0.9264
杉耳九沟	0.0187	—	0.9855	0.9362	0.9474	0.9310	0.9380
木斯沟	0.0313	0.0146	—	0.9504	0.9623	0.9313	0.9380
两河口	0.0830	0.0660	0.0509	—	0.9883	0.9429	0.9431
牟尼沟	0.0689	0.0540	0.0384	0.0118	—	0.9490	0.9515
榆林宫	0.0845	0.0715	0.0712	0.0588	0.0524	—	0.9823
鸭嘴牧场	0.0765	0.0640	0.0614	0.0586	0.0497	0.0178	—

聚类结果(图 3)表明,7 个自然种群聚成两支:YZMC、YLG、MNG 和 LHK 聚成一支;MSG、SEJG 和 DXB 聚成另外一支。即 MNG 和 LHK 种群遗传距离最小,优先聚在一起,然后再与 YLG 和 YZMC 聚在一起;MSG 和 SEJG 聚类后,再与 DXB 种群聚成另外一支。聚成一支的表明它们有较近的亲缘关系。结合桃儿七种群地理分布,聚类情况为位于北部的打西坝、杉耳九沟及中部木斯沟 3 个种群聚在一起;位于北部的两河口和牟尼沟 2 个种群聚在一支,再和位于南部的榆林宫、鸭嘴牧场 2 个种群聚在一起。

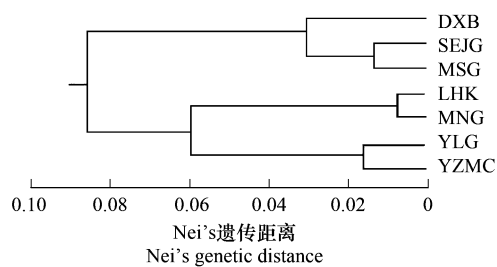


图 3 桃儿七种群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for seven populations of *S. hexandrum* based on Nei's genetic distance

3 结论与讨论

3.1 桃儿七的遗传多样性

通过 RAPD 标记对桃儿七 7 个自然种群的研究表明:川西地区桃儿七 7 个自然种群在物种水平的多态位点百分率(PPB)为 28.83%,稍高于采用 AFLP 标记对相同的这 7 个种群在物种水平的 PPB(25.93%)^[7];但它比分布在我国云南的 6 个桃儿七种群 PPB(DALP 分析的 PPB = 69.33%)^[8]以及分布在印度 Chanb 和 Kullu 地区的 *Podophyllum. hexandrum*(桃儿七的同种异名) PPB(RAPD 标记的 PPB = 100%)都低得多^[9];也比我国已进行 RAPD 标记的一些濒危植物如长叶红砂(PPB = 89.47%)^[12]、崖柏(PPB = 72.09%)^[13]、明党参(PPB = 69%)^[14]、水杉(PPB = 52.89%)^[15]、版纳青梅(PPB = 53.68%)^[16]、华木莲(PPB = 53.22%)^[17]的多态位点百分率都要低得多些;还稍低(或者说接近)于闽楠(PPB = 36.88%)^[18]、银杉(PPB = 32%)^[19];仅比极度濒危植物五针白皮松(PPB = 6.45%)^[20]要高。Shannon's 信息指数表明结果是物种水平的值($H_o=0.0987$)高于种群水平($H_o=0.0269$)。本研究中桃儿七的 Nei's 遗传多样性(H_e)为 0.0337 也是明显低于前叙的濒危植物如版纳青梅($H_e=0.1686$)、华木莲($H_e=0.1847$),仅比极度濒危植物五针白皮松($H_e=0.019$)要高些。以上数据都表明川西地区桃儿七的遗传多样性处于较低的水平。

在所有种群中,牟尼沟(MNG)种群的遗传多样性水平最高(PPB 为 16.22%, H_e 为 0.0362),打西坝(DXB)种群次之(PPB 为 11.71%, H_e 为 0.0224),木斯沟(MSG)种群的遗传多样性水平最低(PPB 为 4.50%, H_e 为 0.0065)。通过实地考察发现,所有种群的生境都遭受不同程度的破坏,估计是天保工程实施以前,大量砍伐林木所致。遗传多样性最高的牟尼沟种群位于自然保护区,生境保护相对完好;而遗传多样性相对低的

木斯沟种群,当地居住有村民,每天有大量人(畜)活动,桃儿七生境几乎全被破坏,桃儿七被大量采挖,残存的植株生长细弱,同其它种群相比,植株提前进入衰老状态。很多物种的遗传多样性研究结果表明,物种生境的破坏,不仅缩小了物种适宜的生存环境,而且增加了相近个体的交配机会。桃儿七在自然状况下是一种自花授粉为主的植物^[3]。自花授粉往往就要导致遗传多样性的丧失。因此,对桃儿七来说,生境的破坏和以自交为主的繁育方式很可能就是其遗传多样性的降低、导致其成为稀有濒危物种的重要原因。

3.2 桃儿七种群的遗传结构

应用 RAPD 之类显性标记揭示种群间遗传分化时,学者们倾向于将 0/1 矩阵视为表型数据而采用分子变异分析(AMOVA)和 Shannon 表型多样性指数分析。本研究采用 Shannon 表型多样性指数和 AMOVA 分析方法,分别揭示出桃儿七种群间的变异占 69.06% 和 68.74%,两者结果相近。桃儿七种群间已出现了很强的遗传分化。据文献报道,通过同工酶和 RAPD 分析,远交物种的 G_{st} 为 0.2,近交或自交物种为 0.5^[24-25]。本研究表明桃儿七遗传分化指数(G_{st})值高于通过 RAPD 研究得出的一些自交物种 G_{st} 的平均值,这个结果与对桃儿七的繁殖生物学研究结果是一致的,即桃儿七是一个自交或自交占优势的物种^[3]。

基因流在许多稀有植物中较低,有时甚至缺少基因流^[26]。在自然状况下,桃儿七种子传播距离是很短的。通常桃儿七果实成熟后直接掉下地,经过雨水作用,就有一些种子遗留在土中,第二年春夏之际即萌发成苗;偶尔其种子由牲畜短距离在同种群内扩散,极少情形下因鸟类或人为活动在种群内或种群间传播,因此种子短距离传播是造成由桃儿七有限基因流的原因。在野外实地考察发现,桃儿七种群分布存在比较明显的破碎化,生境面积变小造成种群内个体数量减少,因此有限的基因流增大了遗传漂变效应,易造成基因频率小的等位基因丧失,使得种群间遗传分化增大,这可能是桃儿七濒危的主要原因之一。另外, Mantel 测试表明遗传距离和地理距离之间没有明显的相关性。从聚类分析的结果,虽然分布于松潘县境内地理距离较近的两河口和牟尼沟种群其遗传一致度最高,遗传距离就较小;而地理距离较远的分布于北部的打西坝和分布于中南部榆林宫种群间遗传一致度最小,遗传距离最大;地理距离最远的两个种群(即最靠北的两河口种群和地理位置最靠南的鸭嘴牧场种群)间遗传距离并不是最大的,也就是说总体上并不是地理距离越远,遗传距离越大,地理距离越近,遗传距离越小。我们分析产生这种现象的主要原因在于,桃儿七分布范围较广,可能由于种群分布的经度(介于 101°E—104°E)、纬度(28°N—33°N)变化,由此造成不同种群所处位置的温度、水分、光照、土壤等生态因子发生一定程度的变化,环境变异性强,不同种群所承受的生境选择压力存在较大差异,最终导致种群间的遗传距离与地理距离可能存在较低水平上的关联性。种群间有限的基因流与种群的空间地理隔离的关系尚需进一步深入研究。

3.3 桃儿七遗传多样性的保护策略

了解物种的遗传结构是进行物种保护最重要的一环,对于制定科学的保护和物种恢复策略起着极为重要的作用。通过以上 RAPD 标记分析,我们了解了川西地区桃儿七种群的遗传多样性和种群遗传结构状况,对四川西部地区濒危植物桃儿七提出以下保护策略:

(1) 实施原位保护策略

基于 RAPD 标记的桃儿七遗传多样性低这一现状,可对其实施原位保护策略。在就地保护时除了对所有种群进行必要的保护外,应选择遗传多样性水平高的种群进行重点保护,如本研究中的松潘县牟尼沟(MNG)种群,其次为红原县打西坝(DXB)种群。

(2) 实施迁地保护策略

基于 RAPD 标记的桃儿七遗传多样性主要保持在种群之间,种群间变异量接近 70%,因此在桃儿七迁地保护时应尽量在较多的种群中取样,尽量保护所有现有种群。

(3) 保护和重建桃儿七种群的适宜生境

桃儿七对生长环境要求特殊,建议有关部门对桃儿七较为集中的生长地采取封山或禁牧,禁止滥采乱挖等措施。只有保护好它的生境,才能保证它正常生长、繁育,从而保护其遗传多样性。

参考文献 (References):

- [1] 应俊生. 小檗科八角莲属和桃儿七属(新属)的研究. 植物分类学报, 1979, 17(1): 15-23.
- [2] 杨显志, 邵华, 张玲琪, 周成, 宣群, 杨春燕. 鬼臼毒素资源研究现状. 中草药, 2001, 32(11): 1042-1044.
- [3] 马绍宾, 胡志浩. 桃儿七分布格局与生态适应的初步研究. 武汉植物学研究, 1996, 14(1): 47-54.
- [4] 傅立国. 中国植物红皮书——稀有濒危植物, 第一册. 北京: 科学出版社, 1992: 184-184.
- [5] 马绍宾, 胡志浩. 小檗科鬼臼亚科植物核型研究. 云南植物研究, 1996, 18(3): 325-330.
- [6] Kosenko V N. Comparative karyological study of representatives of the family Berberidaceae. Botanicheskii Zhurnal, 1979, 64(11): 1539-1552.
- [7] Xiao M, Li Q, Guo L, Luo T, Duan W X, He W X, Wang L, Chen F. AFLP analysis of genetic diversity of the endangered species *Sinopodophyllum hexandrum* in the tibetan region of Sichuan province, China. Biochemical Genetics, 2006, 44(1): 47-60.
- [8] 吴刚, 虞泓, 崔光芬. 云南桃儿七遗传多样性的 DALP 分析. 中草药, 2009, 40(6): 951-955.
- [9] Sharma K D, Singh B M, Sharma T R, Katoch M, Guleria S. Molecular analysis of variability in *Podophyllum hexandrum* Royle an endangered medicinal herb of northwestern Himalaya. Plant Genetic Resources Newsletter, 2000, 124: 57-61.
- [10] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [11] 邹喻萍, 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.
- [12] 张颖娟, 王玉山. 濒危小灌木长叶红砂种群的遗传多样性. 林业科学, 2008, 44(12): 43-47.
- [13] 张仁波, 窦全丽, 何平, 邓洪平. 濒危植物崖柏遗传多样性研究. 广西植物, 2007, 27(5): 687-691.
- [14] 邱英雄, 傅承新. 明党参的濒危机制及其保护对策的初步研究. 生物多样性, 2001, 9(2): 151-156.
- [15] 李春香, 杨群, 周建平, 范深厚, 杨洪. 水杉自然居群遗传多样性的 RAPD 研究. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(1): 59-63.
- [16] 李巧明, 许再富, 何田华. 濒危植物版纳青梅保护遗传学研究初报. 植物学报, 2002, 44(2): 246-249.
- [17] 林新春, 俞志雄, 裘利洪, 肖国民, 刘力. 濒危植物华木莲的遗传多样性研究. 江西农业大学学报, 2003, 25(6): 805-810.
- [18] 江香梅, 温强, 叶金山, 肖复明, 江梅. 闽楠天然种群遗传多样性的 RAPD 分析. 生态学报, 2009, 29(1): 438-444.
- [19] 汪小全, 邹喻萍, 张大明, 洪德元, 刘正宇. 银杉遗传多样性的 RAPD 研究. 中国科学(C 辑), 1996, 26(5): 436-441.
- [20] 张志勇, 李德铎. 极度濒危植物五针白皮松的保护遗传学研究. 云南植物研究, 2003, 25(5): 544-550.
- [21] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, Ye Z H, Mao J X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, Canada: University of Alberta, 1997.
- [22] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 1992, 131: 479-491.
- [23] Miller M P. Tools for Population Genetic Analysis (TEPGA), Version 1. 3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Arizona, USA, 1997.
- [24] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species//Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, Weir B S. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1989: 43-63.
- [25] Nybom H, Bartish I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 2000, 3(2): 93-114.
- [26] Slatkin M. Gene flow in natural populations. Annual Reviews Ecology Systematics, 1985, 16: 393-430.