

樟科濒危植物思茅木姜子遗传多样性的ISSR分析

陈俊秋^{1,2} 慈秀芹^{1,2} 李巧明¹ 李捷^{1*}

1 (中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部植物系统与保护生物学实验室, 昆明 650223)

2 (中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 本文采用ISSR标记对中国特有且仅在云南南部狭域分布的樟科濒危植物思茅木姜子(*Litsea szemaois*)现存8个居群的遗传多样性进行了研究。从96条引物中筛选出了10条, 对103个个体进行了扩增, 共扩增出77条条带, 其中多态性条带为67条。分析结果表明: (1) 思茅木姜子的遗传多样性水平很高。在物种水平上, 多态位点百分率 $PPB=87.01\%$, 平均每个位点的有效等位基因数 $N_e=1.4006$, Nei's基因多样性指数 $H=0.2466$, Shannon多样性信息指数 $H_{sp}=0.3826$; 在居群水平上, $PPB=37.99\%$, $N_e=1.2500$, $H=0.1418$, Shannon多样性信息指数 $H_{pop}=0.2088$ 。(2) 居群间的遗传分化较低。基于Nei's遗传多样性分析得出的居群间遗传分化系数 $G_{st}=0.3700$; Shannon's居群分化系数 $((H_{sp}-H_{pop})/H_{sp})$ 为0.45。AMOVA分析显示: 思茅木姜子的遗传变异主要存在于居群内, 占总变异的72.99%, 居群间的遗传变异占27.01%, 表明思茅木姜子属于异交种。(3) 两两居群间的Nei's遗传一致度(I)的范围为0.8233–0.9761。经Mantel检测, 居群间的遗传距离和地理距离之间不存在显著的正相关关系($r=0.0925$, $P=0.6931$)。我们推断人类活动的干扰和生境的片断化是导致思茅木姜子濒危现状的主要因素。考虑到目前其遗传多样性水平虽然很高, 但各居群个体数量很少, 因此应该对思茅木姜子各居群的所有个体实施及时的就地保护; 而遗传变异大部分存在于居群内的个体间, 所以在迁地保护时应在各居群内大量采样。

关键词: *Litsea szemaois*, 特有濒危植物, ISSR, 遗传多样性, 遗传结构

Genetic diversity of *Litsea szemaois*, an endangered species endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR)

Junqiu Chen^{1,2}, Xiuqin Ci^{1,2}, Qiaoming Li¹, Jie Li^{1*}

1 Laboratory of Plant Phylogenetics and Conservation Biology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223

2 The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

Abstract: *Litsea szemaois* is a critically endangered species endemic to southern Yunnan, China. We assessed the genetic variability within and among eight extant populations of this species using ISSR PCR (10 primers). We expected a low genetic diversity level, but our results revealed an extraordinarily high level of specific genetic diversity (at species level: percentage of polymorphic loci $PPB=87.01\%$, effective number of alleles $N_e=1.4006$, Nei's (1973) gene diversity $H=0.2466$, and Shannon's Information index $H_{sp}=0.3826$; at population level: $PPB=37.99\%$, $N_e=1.2500$, Nei's (1973) gene diversity $H=0.1418$, and Shannon's Information index $H_{pop}=0.2088$). The differences among populations in levels of genetic diversity were very obvious, with the highest level ($PPB=72.73\%$) in Mandian population and the lowest level ($PPB=18.18\%$) in Jinghong population. A low level of genetic differentiation among populations was detected based on Nei's genetic diversity analysis (37%), Shannon's diversity index (45%), and AMOVA (27.01%). This may result from out-breeding. Pairwise genetic identity (I) values among populations ranged from 0.8233 to 0.9761. There was no correlation between genetic and geographic distance among the populations studied. The influence of human activity and forest fragmentation may play a prominent role in creating this species's current endangered status.

收稿日期: 2006-05-25; 接受日期: 2006-07-24

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目(樟科濒危植物思茅木姜子的保护遗传学研究)和国家自然科学基金项目(30470123)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: jieli@xtbg.ac.cn

Key words: *Litsea szemaois*, endangered and endemic plant, ISSR, genetic diversity, genetic structure

思茅木姜子(*Litsea szemaois*)是樟科木姜子属中的杯托组(Sect. *Cylicodaphne*)植物,为我国云南省南部热带季雨林的特有树种(李捷和李锡文, 2006)。思茅木姜子具有在系统演化上较为独特的假伞形花序(3–5个伞形花序生于短枝上呈总状花序),是解决和认识木姜子属系统发育极为重要的科学研究材料;同时作为热带雨林演替后期的树种,它在维持森林生态系统平衡中起着重要作用,是物种多样性的重要组成成分,具有重要的保护价值(Li *et al.*, 2004)。

思茅木姜子主要分布于西双版纳地区低丘雨林和沟谷雨林的中层(郭晓荣等, 2004),其分布区很窄。据《中国植物红皮书: 稀有濒危植物》记载,其仅见于云南南部勐海、景洪和勐腊三县海拔800–1,500 m的密林中,属狭域分布植物,为濒危种(傅立国, 1992)。但在本项目开展初期,在对上述三县思茅木姜子的记载分布地进行认真的野外实地考察与采样时,在勐海县却未发现有思茅木姜子分布,在其余两县也仅发现8个自然居群。在野外调查时还发现,思茅木姜子分布范围小,居群数量和个体数量均很少,自然更新缓慢;加上近年来日益强烈的人类活动干扰导致的森林片断化及生境的不断恶化,其生存已经受到了严重的威胁。而目前对思茅木姜子除在植物生态学方面有研究报道外(郭晓荣等, 2004),其他学科的研究尤其是对该物种在DNA水平上的遗传多样性等保护生物学的相关研究至今尚未见报道。

ISSR(inter-simple sequence repeat)分子标记是一种简单重复序列区间扩增多态性分子标记,具有DNA样品用量少、操作简单、快速灵敏和实验成本低等优点,而且实验重复性好、信息量大且多态性高,因而是一种非常理想的检测物种内遗传变异的分子标记,已被广泛应用于遗传多样性分析和居群生物学研究(钱韦等, 2000; 杨淑达等, 2005)、品种鉴定(Prevost & Wilkinson, 1998),以及物种的分类系统学比较(Huang & Sun, 2000; Joshi *et al.*, 2000)等方面,同时也成为构建遗传图谱的有力工具(Kojima *et al.*, 1998; Sankar & Moore, 2001)。

本文采用ISSR分子标记对仅存的8个思茅木姜

子自然居群的遗传多样性进行了研究,旨在阐明其遗传多样性水平和遗传结构,分析其致濒机制,从而为制定科学有效的保护策略和措施提供基础资料和科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

取样尽量覆盖该物种的整个分布范围。由于该种植物分布比较狭窄,我们对仅存于景洪和勐腊县的8个自然居群均进行了取样。采样时间为2004年9月,各个居群的具体位置和采样个体数详见表1和图1。所取样品为植株的叶片,在野外迅速用硅胶干燥保存。

1.2 DNA的提取与PCR扩增

思茅木姜子总DNA的提取采用改进后的CTAB法(Doyle & Doyle, 1987),每次取1.0–1.5 cm²干燥的叶片组织。

PCR反应在GeneAmp 9700 Thermocycler PCR仪上进行。25 μL反应体系包括: 10×Buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 50 mmol/L KCl) 2.5 μL, 5 U/μL的Taq DNA聚合酶(TAKARA, 宝生物工程(大连)有限公司) 0.2 μL, 25 mmol/L的MgCl₂ 2.0 μL, 10 mmol/L的dNTPs(TAKARA, 宝生物工程(大连)有限公司) 2.0 μL, 15 μmol/L的引物(上海生工生物工程有限公司) 1.0 μL, 10%的DMSO 5.0 μL, 50 ng/μL的模板DNA 1.0 μL, 以及ddH₂O 11.3 μL。

扩增程序: 94°C 5 min; 94°C 50 s, 退火(温度视不同引物而定) 50 s, 72°C 2 min, 45个循环; 72°C 10 min。电泳条件: PCR扩增产物在1.5%的琼脂糖凝胶上电泳(1×TBE, 100V)分离,以DNA Marker DL2000 (100–2,000 bp)(TAKARA, 宝生物工程(大连)有限公司)为分子标记,溴化乙锭(EB)染色显带。DNA片段通过凝胶成像系统(SYNGENE)观察记录。

1.3 数据分析

将ISSR琼脂糖凝胶电泳图谱记录后进行人工读带,以DNA Marker DL2000 (100–2,000 bp)作为相对分子量标准,由同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点的产物(杨淑达等, 2005)。

表1 用于ISSR分析的8个思茅木姜子天然居群
Table 1 Populations of *Litsea szemaois* for ISSR analyses

居群编号 Population code	分布地 Locality	居群大小 Population size	采样数 Sample size	海拔 Altitude (m)	纬度 Latitude	经度 Longitude
勐仑 ML	勐腊勐仑 Menglun, Mengla County	17	16	537–700	21°55'N	101°16'E
龙林 LL	勐腊龙林 Longlin, Mengla County	7	5	670	21°32'N	101°30'E
基诺山 JNS	勐腊基诺山 Jinuoshan, Mengla County	8	6	1,050–1,170	22°02'N	101°00'E
纳板河 NBH	景洪纳板河 Nabanhe Nature Reserve, Jinghong County	19	11	718–750	22°09'N	100°40'E
过门山 GMS	景洪过门山 Mt. Guomen, Jinghong County	29	24	900–1,000	22°14'N	100°36'E
小糯友 XNY	景洪小糯友 Xiaonuoyou, Jinghong County	8	6	1,100–1,200	22°14'N	100°37'E
曼点 MD	景洪曼点 Mandian, Jinghong County	41	31	690–710	22°07'N	100°39'E
景洪 JH	景洪市自然保护区 Jinghong Nature Reserve	4	4	1,050	22°02'N	100°54'E

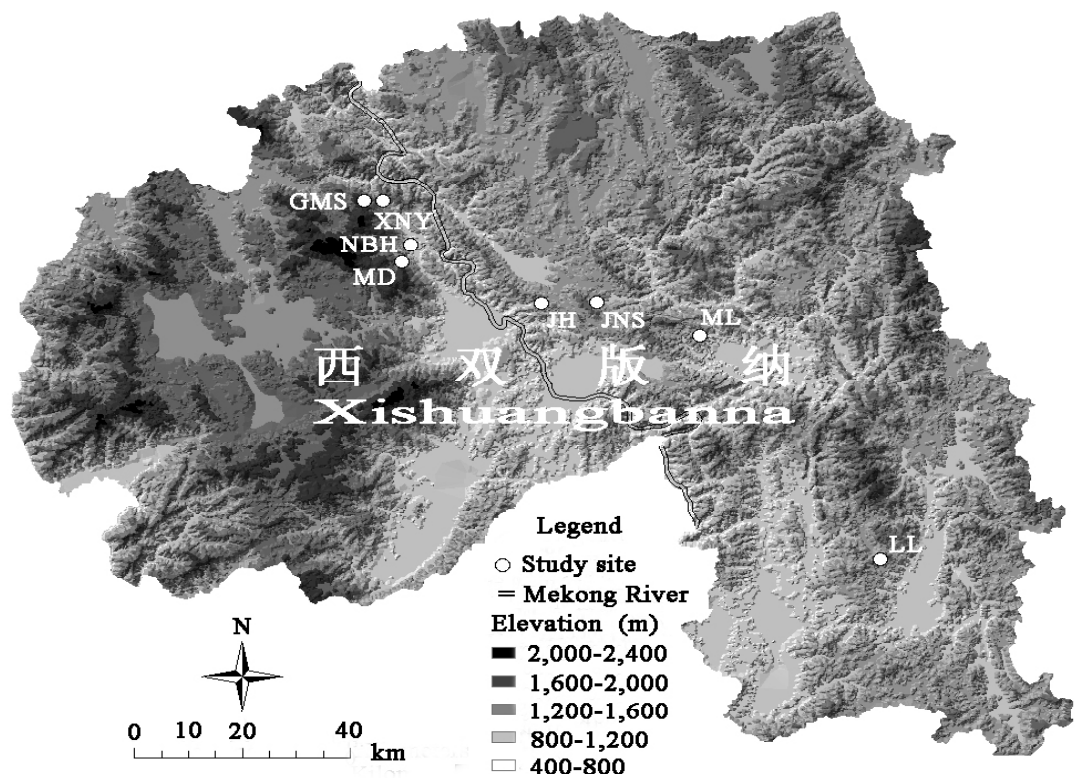


图1 8个思茅木姜子居群的取样分布图(居群代号同表1)
Fig. 1 Map showing locations of the eight sampled *Litsea szemaois* populations. Population codes are the same as in Table 1.

按同源性条带的有无分别以1和0的格式记录并输入计算机, 构成ISSR表型数据矩阵输入POPGENE 1.32软件(Yeh *et al.*, 1997)进行分析。统计下列参数: 多态位点百分率(*PPB*)、Shannon多样性信息指数(H_0 , 在物种水平上为 H_{sp} , 在居群水平上为 H_{pop})、Nei's基因多样性指数(H)、平均每个位点的观察等位基因数(N_a)、平均每个位点的有效等位基因数(N_e)、总的基因多样性(H_t)、居群内基因多样性(H_s)、基因分化系数(G_{st})、基因流(N_m)、Nei's遗传距离(D)和遗传一致度(I), 并据此用UPGMA方法进行聚类, 分析各群体之间的遗传关系。运用DCFA1.1(张富民和葛颂, 2001)对ISSR表型数据矩阵进行计算, 得到表型间的距离系数, 组成WINAMOVA所需要的距离系数(δ^2)矩阵文件, 即距离文件(.dis), 然后运用WINAMOVA软件(Excoffier, 1993)对居群间和居群内的遗传变异进行分子变异分析(AMOVA)(张富民和葛颂, 2002)。同时也通过Shannon's居群分化系数($(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$)来估测居群间的遗传变异。运用TFPGA 1.3 (Miller, 1997)检测居群间的遗传距离和地理距离间的相关性(置换3,000次)。

2 结果

2.1 引物筛选结果

从96条ISSR引物(加拿大哥伦比亚大学UBC Primer Set No.9, http://www.biotech.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers.pdf)(上海生工合成)中筛选出10条条带清晰、重复性和稳定性好且多态性条带相对较多的引物用于全部DNA样品的PCR扩增(表2)。

2.2 思茅木姜子的ISSR遗传多样性

用所选的10个引物对思茅木姜子的103个个体进行扩增, 所得片段在100–2,000 bp之间。共检测到77个清晰、可重复的有效位点, 其中多态位点有67个。分析结果表明: 在物种水平上, 思茅木姜子具有较高的多态位点百分率($PPB = 87.01\%$)(表3)、平均每个位点的有效等位基因数($N_e=1.4006\pm 0.3315$)、Nei's基因多样性($H=0.2466\pm 0.1714$)和Shannon's多样性信息指数($H_{sp}=0.3826 \pm 0.2333$)(表4)。在居群水平上, 各个居群的多态位点百分率(PPB) 差异较大 (18.18–72.73%), 平均值为37.99%

表2 ISSR引物序号与序列
Table 2 List of ISSR primers and their sequences used in the study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
808	(AG) ₈ C
811	(GA) ₈ C
826	(AC) ₈ C
827	(AC) ₈ G
841	(GA) ₈ YC
842	(GA) ₈ YG
844	(CT) ₈ RC
866	(CTC) ₅
891	HVH(TG) ₇
895	AGA GTT GGT ACG TCT TGA TC

(表3), 平均每个位点的有效等位基因数(N_e)为1.2500(± 0.3585), Nei's基因多样性指数(H)为0.1418(± 0.1913), 各个居群的Shannon指数(H_0)为0.1160–0.3894, 平均值 H_{pop} 为0.2088(± 0.2729) (表4)。

Shannon多样性指数显示了各居群的遗传变异由高到低依次为曼点(MD)>过门山(GMS)>勐仑(ML)>小糯友(XNY)>基诺山(JNS)>纳板河(NBH)>龙林(LL)>景洪(JH)(表4), 与 PPB 值分析的结果(表3)基本一致。各居群间的遗传多样性差别较大, 其中景洪曼点居群(MD)的遗传多样性水平最高($PPB=72.73\%$, $N_e=1.4503$, $H=0.2621$, $H_0=0.3894$), 景洪自然保护区居群(JH)的遗传多样性水平最低($PPB = 18.18\%$, $N_e=1.1561$, $H=0.0817$, $H_0=0.1160$)(表3, 4)。

2.3 思茅木姜子居群的遗传变异

用POPGENE计算出的遗传变异分析结果(表5)表明: 思茅木姜子各居群间存在着一定的遗传分化。8个自然居群总的遗传多样性 $H_t = 0.2251$, 其中居群内遗传多样性 $H_s=0.1418$, 居群间的基因多样性($D_{st}=H_t-H_s$)为0.0833, Nei的基因分化系数 $G_{st}=0.3700$, 表明有37%的遗传变异存在于居群间, 63%的遗传变异存在于居群内, 居群内的遗传分化大于居群间的分化。居群间基因流($N_m=0.5(1-G_{st})/G_{st}$)为0.8513, 基因流较小。

根据Shannon's多样性指数的分析结果(物种水平上 $H_{sp}=0.3826$, 居群水平上 $H_{pop}=0.2088$)(表4), 计算出Shannon's居群分化系数($(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$)为0.45, 即有45%的遗传变异分布在居群间, 55%的遗传变

表3 思茅木姜子各居群的多态位点百分率(PPB)统计(居群代号同表1)
Table 3 The PPB statistics of *Litsea szemaois* populations. Population codes are given in Table 1.

居群编号 Population code	采样数(株) Sample size	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率 PPB (%)
勐仑 ML	16	36	46.75
龙林 LL	5	19	24.68
基诺山 JNS	6	23	29.87
纳板河 NBH	11	23	29.87
过门山 GMS	24	39	50.65
小糯友 XNY	6	24	31.17
曼点 MD	31	56	72.73
景洪 JH	4	14	18.18
平均 Mean	12.875	29.25	37.99
物种水平 At species level	103	67	87.01

表4 思茅木姜子居群的遗传多样性(居群代号同表1)
Table 4 The genetic variation of *Litsea szemaois* populations. Population codes are given in Table 1.

居群编号 Population code	等位基因观察值 N_a	有效等位基因数 N_e	Nei's 基因多样性 H	Shannon's 指数 H_o
勐仑 ML	1.4675 ± 0.5022	1.3009 ± 0.3816	0.1720 ± 0.2065	0.2540 ± 0.2953
龙林 LL	1.2468 ± 0.4339	1.1611 ± 0.3151	0.0929 ± 0.1728	0.1375 ± 0.2503
基诺山 JNS	1.2987 ± 0.4607	1.2029 ± 0.3563	0.1136 ± 0.1896	0.1669 ± 0.2709
纳板河 NBH	1.2987 ± 0.4607	1.1859 ± 0.3311	0.1072 ± 0.1813	0.1592 ± 0.2618
过门山 GMS	1.5065 ± 0.5032	1.3270 ± 0.4011	0.1836 ± 0.2123	0.2700 ± 0.3006
小糯友 XNY	1.3117 ± 0.4662	1.2159 ± 0.3624	0.1210 ± 0.1936	0.1773 ± 0.2769
曼点 MD	1.7273 ± 0.4483	1.4503 ± 0.3702	0.2621 ± 0.1951	0.3894 ± 0.2758
景洪 JH	1.1818 ± 0.3882	1.1561 ± 0.3499	0.0817 ± 0.1791	0.1160 ± 0.2516
平均 Mean	1.3799 ± 0.5208	1.2500 ± 0.3585	0.1418 ± 0.1913	0.2088 ± 0.2729
物种水平 At species level	1.8701 ± 0.3384	1.4006 ± 0.3315	0.2466 ± 0.1714	0.3826 ± 0.2333

N_a , Observed number of alleles; N_e , Effective number of alleles; H , Nei's (1973) gene diversity; H_o , Shannon's information index (Mean, H_{pop} ; At species level, H_{sp})

表5 思茅木姜子居群基因多样性Nei's分析
Table 5 Nei's (1987) analysis of gene diversity in *Litsea szemaois* populations

	总基因多样性 H_t	居群内基因多样性 H_s	基因分化系数 G_{st}	基因流 N_m
平均 Mean	0.2251	0.1418	0.3700	0.8513
标准差 Standard deviation	0.0286	0.0124		

H_t , Total gene diversity; H_s , Gene diversity within populations; G_{st} , Coefficient of gene differentiation; N_m , Gene flow, $N_m=0.5(1-G_{st})/G_{st}$ (McDermott & McDonald, 1993)

异分布在居群内部。此结果略高于POPGENE的分析结果。

用AMOVA进行的基于欧氏距离平方的遗传变异巢式方差分析结果也显示思茅木姜子的遗传变异主要存在于居群内, 占总变异的72.99%, 居群间的遗传变异占27.01%($P<0.001$)(表6)。此结果略低于POPGENE的分析结果。

尽管三种方法分析的结果在数值上有差异, 但是所揭示的思茅木姜子居群间遗传分化的趋势是一致的, 都表明遗传变异主要存在于居群内, 居群内的遗传分化大于居群间的分化。

2.4 居群间遗传距离和遗传一致度

用POPGENE计算出了思茅木姜子8个居群两两居群间的Nei's遗传一致度(I), 其范围为 0.8233 –

表6 思茅木姜子的AMOVA分析

Table 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) for *Litsea szemaois* based on ISSR data

谱系结构 Source of variance		方差总和 SSD	平均方差 MSD	变异组分 Variance component	变异百分率 Percentage of total variance (%)	P*
居群间	Variance among populations	3.0998	0.443	0.0297	27.01	< 0.001
居群内	Variance within populations	8.4663	0.089	0.0891	72.99	< 0.001

P值表示比观察值的变异大的概率, 这个概率是通过把居群中的样本经过1,000次随机排列改变计算得到的。
SSD, Sum of squared deviation; MSD, Mean of squared deviation. * P-values are the probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone. Probabilities were calculated by 1,000 random permutations of individuals across populations.

表7 思茅木姜子8个居群间的Nei's(1978)遗传一致度(I)(对角线上方)和遗传距离(D)(对角线下方)(居群代号同表1)

Table 7 Nei's (1978) genetic identity (*I*, above diagonal) and genetic distance (*D*, below diagonal) of eight *Litsea szemaois* populations. Population codes are given in Table 1.

	勐仑 ML	纳板河 NBH	过门山 GMS	小糯友 XNY	曼点 MD	龙林 LL	基诺山 JNS	景洪 JH
勐仑 ML	****	0.9761	0.8882	0.8664	0.9047	0.8579	0.8392	0.8343
纳板河 NBH	0.0242	****	0.8902	0.8648	0.8976	0.8583	0.8313	0.8233
过门山 GMS	0.1185	0.1163	****	0.9640	0.9466	0.8944	0.8928	0.8965
小糯友 XNY	0.1434	0.1453	0.0367	****	0.9318	0.8890	0.8773	0.9151
曼点 MD	0.1002	0.1080	0.0549	0.0706	****	0.9468	0.9455	0.9280
龙林 LL	0.1533	0.1528	0.1116	0.1176	0.0547	****	0.9412	0.9415
基诺山 JNS	0.1753	0.1848	0.1134	0.1309	0.0561	0.0607	****	0.9284
景洪 JH	0.1811	0.1945	0.1093	0.0887	0.0748	0.0603	0.0743	****

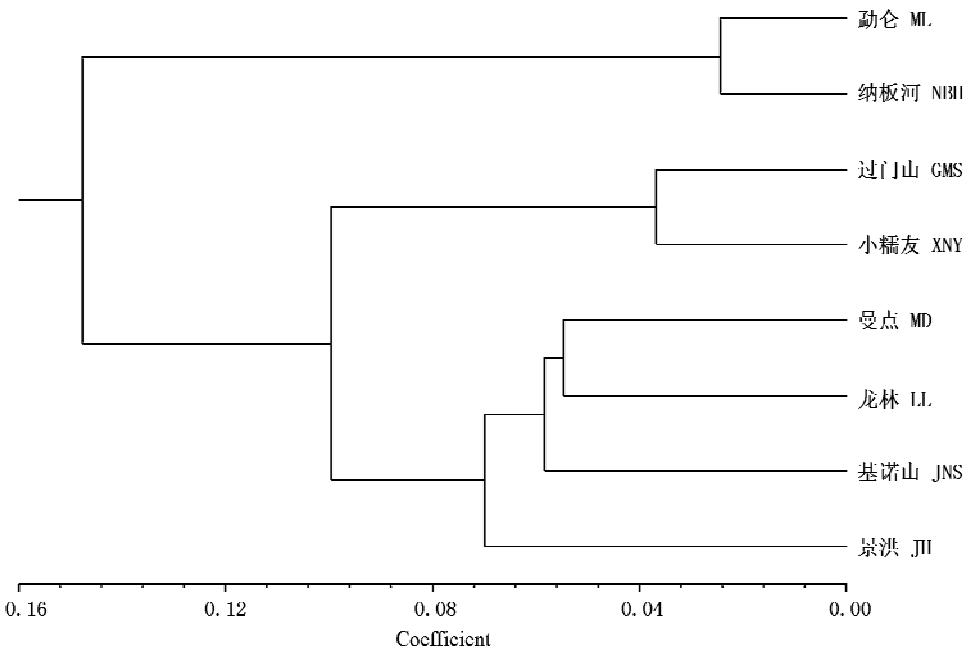


图2 思茅木姜子居群的Nei's(1978)遗传距离的UPGMA聚类图(居群代号同表1)

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *Litsea szemaois* populations based on Nei's (1978) genetic distance. Population codes are given in Table 1.

0.9761; 遗传距离(*D*)的范围从0.0242–0.1945(表7)。度最高($I = 0.9761$), 遗传距离最近($D = 0.0242$), 同
其中, 勐仑(ML)和纳板河(NBH)居群间的遗传一致时在 UPGMA 聚类图中也聚在了一起; 纳板河

(NBH)与景洪居群间的遗传一致度最低($I = 0.8233$), 遗传距离最远($D = 0.1945$), 在UPGMA聚类图中各自的分支也距离最远(图2)。经Mantel检测, 居群间的遗传距离和地理距离之间不存在显著的正相关关系($r = 0.0925$, $P = 0.6931$)。

3 讨论

3.1 遗传多样性

通常认为特有种、濒危种和狭域种的遗传多样性水平较低(Hamrick & Godt, 1990; Falk & Holsinger, 1991; 洪德元等, 1995; Li *et al.*, 2002)。但是也有研究报道表明有些特有种、狭域种甚至濒危种也能保持较高水平的遗传多样性(Richter *et al.*, 1994; Ge *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2000; Zawko *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2004; 宋卫华等, 2004)。

思茅木姜子虽然是仅分布于云南省南部热带季雨林的特有狭域树种, 却具有较高水平的遗传多样性。与已有研究报道的樟科其他物种相比, 如舟山新木姜子(*Neolitsea sericea*)的遗传多样性为

$PPB = 50.5\%$; 其中自然居群 $PPB = 23.1\%$ (Chung *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005); 厚壳桂(*Cryptocarya chinensis*)种群ISSR分析的遗传多样性为15.29%(王峥峰等, 2005), 思茅木姜子的遗传多样性水平明显较高。与同样利用ISSR技术对其他特有或濒危狭域分布的物种所进行的遗传多样性分析的研究结果相比, 思茅木姜子的遗传多样性水平也明显偏高(表8)。

导致狭域、濒危物种具有高水平遗传多样性的因素有很多, 如新种形成、繁育系统、形态突变、多次奠基者效应或者冰期残余种等(Ranker, 1994; Lewis & Crawford, 1995; Maguire & Sedgley, 1997; Zawko *et al.*, 2001)。朱华和蔡琳(2005)的研究表明, 思茅木姜子所属的云南热带季雨林是在晚第三纪(中新世)以后、青藏高原强烈隆升到相当高度、东亚季风气候形成以后才发育的。因此, 思茅木姜子的种群发生与居群分化的时间较晚。同时我们推测它可能拥有一个广泛连续分布且具丰富遗传基础的祖先, 随着人类活动的日益频繁, 生境的片断化

表8 思茅木姜子与其他特有或狭域濒危物种的ISSR遗传多样性分析结果比较
Table 8 Genetic diversity comparison between *Litsea szemaois* and other endemic or narrow endangered species based on ISSR data

物种 Species	生态现状 Ecological position	多态位点百分 率 PPB(%)	有效等位基 因数 N_e	Nei's 基因多 样性 H	Shannon's 信 息指数 H_o	文献 References
思茅木姜子 <i>Litsea szemaois</i>	特有、狭域、濒危 Endemic, narrow and endangered	87.01	1.4006	0.2466	0.3826	本研究 The present study
明党参 <i>Changium smyrnioides</i>	特有、濒危 Endemic and endangered	84.70	1.4	0.24	0.37	Qiu <i>et al.</i> (2004)
景东报春 <i>Primula interjacens</i>	特有、狭域、濒危 Endemic, narrow and endangered	75.47	—	0.3205	0.4618	Xue <i>et al.</i> (2004)
华木莲 <i>Manglietia decidua</i>	特有 Endemic	17.28	1.1156	0.0649	0.0936	廖文芳等 Liao <i>et al.</i> (2004)
卵叶海桑 <i>Sonneratia ovata</i>	濒危 Endangered	68.65	1.2218	0.1411	0.2292	李海生和陈桂珠 Li & Chen (2004)
黄山梅 <i>Kirengeshoma palmate</i>	濒危 Endangered	79.00	1.55	0.31	0.45	Zhang <i>et al.</i> (2006)
四合木 <i>Tetraena mongolica</i>	特有、濒危 Endemic and endangered	63.30	1.368	0.213	0.324	Ge <i>et al.</i> (2003)
长果秤锤树 <i>Sinojackia dolichocarpa</i>	特有、濒危 Endemic and endangered	72.99	1.3726	0.2255	0.3453	Cao <i>et al.</i> (2005)
五针白皮松 <i>Pinus squamata</i>	特有、濒危 Endemic and endangered	12.30	1.032	0.03	0.02	张志勇和李德铎 Zhang & Li (2005)

N_e , Effective number of alleles; H , Nei's gene diversity; H_o , Shannon's information index

不断加剧, 形成一些基因交流有限且不连续分布的居群, 以至于思茅木姜子虽然保留了其祖先丰富的总体遗传多样性, 但各居群的个体数目和分布范围变小, 居群间分化小, 遗传基础趋于一致, 并最终导致了思茅木姜子在居群水平上遗传多样性相对较低。

3.2 遗传结构

虽然对思茅木姜子繁育系统的研究尚未见报道, 但Rohwer(1993)认为所有樟科植物都倾向于异交, 它们具有雌雄蕊同步异熟的开花机制: A型为雌蕊早晨开放、中午关闭, 雄蕊在当日或次日下午开放; B型为雌蕊下午开放、晚上关闭, 雄蕊在次日早晨开放。这种机制有效地防止了自花授粉的发生。当这种机制因气候条件改变而被打乱时, 可能发生同株授粉, 但所产生的果实在幼果期就会脱落。Bussell(1999)曾对35个物种的RAPD研究结果进行了总结, 发现29个远交物种的居群间变异在总的遗传变异中占0.9–41.3%, 而6个近交物种则为44.8–66.9%。Hogbin和Peakall(1999)也总结了7个物种的RAPD分析结果, 发现异交物种的遗传变异主要分布在居群内, 而居群间的遗传变异分布通常不足27%。根据本研究得出的思茅木姜子居群间遗传分化参数, 即Nei's基因分化指数 $G_{st}=0.37$, Shannon's居群分化系数 $((H_{sp}-H_{pop})/H_{sp})$ 为0.45, AMOVA分析显示居群间变异占总变异的27.01%, 我们推断思茅木姜子的繁育系统类型属于异交型, 这正好与Rohwer(1993)的结论相符合, 并且可能是其居群间遗传分化较小的原因之一。

樟科植物的种子主要依靠鸟类散布, 也有依靠重力散布的(Rohwer, 1993)。我们在对思茅木姜子进行野外考察取样时发现, 在每棵母株下方区域内都有很多幼苗, 因此我们推断思茅木姜子主要依靠重力散布种子, 这可能是思茅木姜子基因流较小的主要原因。现代越来越多的研究证明, 基因流强弱对群体遗传分化具有重要影响(Hartl & Clark, 1989; 葛颂, 2001)。如果说, 自然选择是导致居群分化最主要的力量, 那么基因流则是对抗选择作用的重要因素(葛颂, 1994)。居群遗传学理论认为, 当基因流小于1时, 就不足以抵制居群内因遗传漂变而引起的居群间遗传分化(Slatkin, 1985)。思茅木姜子的基因流小于1($N_m=0.8513$), 很容易发生遗传漂变, 因此遗传漂变可能是影响其遗传分化的重要因素之

一。

Harmrick和Godt(1990)的研究表明, 居群的地理分布和遗传多样性分布没有直接的相关性。经过Mantel检测, 本研究结果表明思茅木姜子的遗传距离和地理距离之间同样没有显著的相关性($r=0.0925$, $P=0.6931$)。比较思茅木姜子的居群分布图(图1)和UPGMA聚类图(图2), 我们不难看出其地理距离与遗传距离并没有呈现出显著的相关性, 其中仅有过门山(GMS)和小糯友(XNY)居群间的地理距离较近, 在聚类图上也聚在了一起; 曼点(MD)和纳板河(NBH)居群间的地理距离最近, 但在UPGMA聚类图(图2)中, 曼点(MD)却和地理距离较远的龙林(LL)聚在一起, 而纳板河(NBH)也和地理距离较远的勐仑(ML)聚在一起且单独形成一支。因此, 地理隔离对思茅木姜子居群遗传分化没有显著影响。

3.3 濒危机制和保护措施

Williamson和Werth(1999)认为狭域分布但遗传多样性水平特别高的濒危种, 并没有经历过瓶颈效应, 而且其居群内的近交不一定导致自交衰退(inbreeding depression), 因此其濒危状况是原生境片段化且地理隔离和人类干扰加强的结果, 这正好符合我们对思茅木姜子致濒的推断。人类活动所导致的森林片段化、生境恶化甚至丧失, 可能使原来广泛连续分布的高水平遗传多样性的大种群片段化分布为地理隔离、范围狭小的各个小种群; 栖息地的变小造成种群内个体数量的减少, 而个体数量变小可能导致基因流水平下降和遗传漂变, 这可能是思茅木姜子濒危的主要原因, 同时也正是许多濒危物种的致濒因素(Eriksson *et al.*, 1995)。

思茅木姜子虽然在物种水平上具有较高水平的遗传多样性($PPB=87.01\%$), 但是在种内居群水平上其遗传多样性却较低($PPB=37.99\%$), 而且居群间基因流有限($N_m=0.8513$), 使小群体的遗传多样性降低, 如景洪(JH)居群仅有4个个体, $PPB=18.18\%$ 。这将会危及整个居群的生存。虽然曼点(MD)居群具有最高的遗传多样性(有31个个体, $PPB=72.73\%$), 但其分布范围和种群数量相对于其他物种仍然非常有限, 如果不能有效维持居群大小和自然更新, 同样可能引起居群的退化甚至灭绝, 使物种的濒危程度加剧(李昂和葛颂, 2002)。此外, 因缺乏有效的基因流, 可能导致居群内遗传基础趋于一致和适应度

的降低,随之可能发生的随机漂变将加大居群间分化(刘占林和赵桂仿,1999),这将使思茅木姜子不能有效地维持目前的遗传多样性水平,加剧其濒危程度。

参照其他濒危物种保护遗传学的研究结果(Hogbin & Peakall, 1999; 葛颂, 2001; Li *et al.*, 2002),我们提出以下保护建议:(1) 针对思茅木姜子总体遗传多样性水平较高,但居群数量和各居群个体数量都较少的现状,对现存所有居群的所有个体实施及时有效的就地保护,尤其是遗传多样性水平最高的曼点(MD)居群,以及遗传多样性水平最低且只有4个个体的景洪(JH)居群,应该得到林业部门和保护区的特别重视;(2) 因为遗传变异主要分布在各居群内的个体间,所以需要在各居群内进行大量的采样用于迁地保护研究。而各居群间存在一定的遗传分化,因此有必要采用不同居群间进行混合繁殖和相互移植的方法,以提高其遗传多样性水平。

本研究旨在为思茅木姜子的保护生物学研究提供遗传变异水平及遗传结构等遗传学信息基础;而一个物种的濒危是许多内外因素综合作用的结果。因此,尚需进一步深入探讨思茅木姜子的进化历史、繁育系统、演替阶段等问题,以进一步准确揭示它的濒危机制,从而制定出合理有效的保护政策和措施。

致谢: 在本项研究的野外实地考察与样品取样阶段承蒙陶国达老师的鼎力支持,在随后样品种类的分类鉴定阶段也得益于李锡文老师的大力协助;论文的绘图工作得到了李红梅老师的大力帮助;此外,不论是在野外还是在实验室工作中都得到了汪书丽、田婕、赵建立和钟晋顺等同学的积极帮助,谨致谢忱。

参考文献

- Bussell JD (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, **8**, 775–789.
- Cao PJ, Yao QF, Ding BY, Zeng HY, Zhong YX, Fu CX, Jin XF (2005) Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 1246–1257.
- Chung MG, Chung MY, Oh GS, Epperson BK (2000) Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* population (Lauraceae). *Heredity*, **85**, 490–497.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11–15.
- Eriksson G, Namkoong G, Robert J (1995) Dynamic conservation of forest tree gene resources. *Forest Genetic Resources*, **23**, 2–5.
- Excoffier L (1993) *Analysis of Molecular Variance (AMOVA) Version 1.55*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Falk DA, Holsinger KE (1991) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York.
- Fu LK (傅立国), Jin JM (金鉴明) (1992) *The Red Data Book of China's Plants: Rare and Endangered Species Vol.1*. (中国植物红皮书: 稀有濒危植物 (第一卷)), pp. 242–260. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Ge S (葛颂) (1994) Allozyme and plant evolutionary biology study. In: *Plant Evolutionary Biology* (植物进化生物学) (eds Chen JK (陈家宽), Yang J (杨继)), pp. 153–208. Wuhan University Press, Wuhan. (in Chinese)
- Ge S (葛颂) (2001) Application of DNA molecular marker in conservation biology. In: *Molecular Markers in Systematic and Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记) (eds Zou YP (邹喻苹), Ge S (葛颂), Wang XD (王晓东)), pp. 140–149. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Ge S, Zhang DM, Wang HQ, Rao GY (1997) Allozyme variation in *Ophiopogon xylorrhizus*, an extreme endemic species of Yunnan, China. *Conservation Biology*, **11**, 562–565.
- Ge XJ, Yu Y, Zhang NX, Chen HS, Qi WQ (2003) Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae). *Biological Conservation*, **111**, 427–434.
- Guo XR (郭晓荣), Cao KF (曹坤芳), Xu ZF (许再富) (2004) Response of photosynthesis and antioxygenic enzymes in seedlings of three tropical forest tree species to different light environments. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **15**, 377–381. (in Chinese with English abstract)
- Hamrick JL, Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 43–63. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hartl DL, Clark AG (1989) *Principle of Population Genetics*, 2nd edn. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hogbin PM, Peakall R (1999) Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, **13**, 514–522.
- Hong DY (洪德元), Ge S (葛颂), Zhang DM (张大明), Wang XQ (汪小全), Cheng SZ (程树志) (1995) Principle and approaches to studying the mechanisms of plant rarity and

- endangerment principles and methods of plant endangering mechanism. In: *Advances in Biodiversity Research—Proceedings of the 1st National Symposium on the Conservation and Sustainable Use of Biodiversity Advances in Biodiversity Research* (生物多样性研究进展——首届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集) (eds Qian YQ (钱迎倩), Zhen RD (甄仁德)), pp. 125–133. Chinese Science and Technology Press, Beijing. (in Chinese)
- Huang JC, Sun M (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**, 1050–1060.
- Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**, 1311–1320.
- Kang U, Chang CS, Kim YS (2000) Genetic structure and conservation considerations of rare endemic *Abeliophyllum distichum* Nakai (Oleaceae) in Korea. *Journal of Plant Research*, **113**, 127–138.
- Kojima T, Nagaoka T, Noda K (1998) Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 37–45.
- Lewis PO, Crawford DJ (1995) Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*, **82**, 141–149.
- Li A (李昂), Ge S (葛颂) (2002) Advances in plant conservation genetics. *Biodiversity Science* (生物多样性), **10**, 61–71. (in Chinese with English abstract)
- Li HS (李海生), Chen GZ (陈桂珠) (2004) Genetic diversity of *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae) in China detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Guihaia* (广西植物), **24**, 17–22. (in Chinese with English abstract)
- Li J, Christophel DC, Conran JG, Li XW (2004) Phylogenetic relationships within the ‘core’ Laureae (*Litsea* complex) (Lauraceae) inferred from sequences of the chloroplast gene *matK* and nuclear ribosomal DNA ITS regions. *Plant Systematics and Evolution*, **246**, 19–34.
- Li J (李捷), Li XW (李锡文) (2006) Notes on the plants of the genus *Litsea* Lam. (Lauraceae) from China. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **28**, 103–107. (in Chinese with English abstract)
- Li QM, Xu ZF, He TH (2002) *Ex situ* conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China. *Biological Conservation*, **106**, 151–156.
- Liao WF (廖文芳), Xia NH (夏念和), Deng YF (邓云飞), Zheng QY (郑庆衍) (2004) Study on genetic diversity of *Manglietia decidua* (Magnoliaceae). *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **26**, 58–64. (in Chinese with English abstract)
- Liu ZL (刘占林), Zhao GF (赵桂仿) (1999) Population genetics and its implications for conservation of rare and endangered plants. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), **7**, 340–346. (in Chinese with English abstract)
- Maguire TL, Sedgley M (1997) Genetic diversity in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) with emphasis on *Banksia cuneata*, a rare and endangered species. *Heredity*, **79**, 394–401.
- McDermott JM, McDonald BA (1993) Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology*, **31**, 353–373.
- Miller MP (1997) *Tools for Population Genetics Analysis* (TFPGA), Version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff.
- Nei M (1973) Analysis of gene frequencies in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **70**, 3321–3323.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, pp. 187–192. Columbia University Press, New York.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1998) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, 107–112.
- Qian W (钱韦), Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元) (2000) Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **42**, 741–750. (in Chinese with English abstract)
- Qiu YX, Hong DY, Fu CX, Cameron KM (2004) Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**, 583–596.
- Ranker TA (1994) Evolution of high genetic variability in the rare Hawaiian fern *Adenophorus periens* and implications for conservation management. *Biological Conservation*, **70**, 19–24.
- Richter TS, Soltis PS, Soltis DE (1994) Genetic variation within and among populations of the narrow endemic *Delphinium viridescens* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, **81**, 1070–1076.
- Rohwer JG (1993) Lauraceae. In: *The Families and Genera of Vascular Plants* Vol. II (eds Kubitzki K, Rohwer JG, Brückner V), pp. 366–391. Springer-Verlag, Berlin.
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 393–430.
- Sankar AA, Moore GA (2001) Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, **102**, 206–214.
- Song WH (宋卫华), Li XD (李晓东), Li XW (李新伟), Huang HW (黄宏文), Li JQ (李建强) (2004) Genetic diversity and conservation strategy of *Psilopogon sinense*, a rare

- species in the Three-Gorges Reservoir area. *Biodiversity Science* (生物多样性), **12**, 227–236. (in Chinese with English abstract)
- Wang ZF (王峥嵘), Gao SH (高三红), Tian SN (田胜尼), Fu SL (傅声雷), Ren H (任海), Peng SL (彭少麟) (2005) Genetic structure of *Cryptocarya chinensis* in fragmented lower subtropical forests in China based on ISSR markers. *Biodiversity Science* (生物多样性), **13**, 324–331. (in Chinese with English abstract)
- Wang ZS, An SQ, Liu H, Leng X, Zheng JW, Liu YH (2005) Genetic structure of the endangered plant *Neolitsea sericea* (Lauraceae) from the Zhoushan Archipelago using RAPD markers. *Annals of Botany*, **95**, 305–313.
- Williamson PS, Werth CR (1999) Levels and pattern of genetic variation in the endangered species *Abronia macrocarpa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 293–301.
- Xue DW, Ge XJ, Hao G, Zhang CQ (2004) High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Primula interjacens* by ISSR analysis. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **46**, 1163–1169.
- Yang SD (杨淑达), Shi SH (施苏华), Gong X (龚洵), Zhou RC (周仁超) (2005) Genetic diversity of *Paeonia delavayi* as revealed by ISSRs. *Biodiversity Science* (生物多样性), **13**, 105–111. (in Chinese with English abstract)
- Yeh EC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997) POP-GENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- Zawko G, Krauss SL, Dixon KW, Sivasithamparam K (2001) Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Molecular Ecology*, **10**, 2389–2396.
- Zhang FM (张富民), Ge S (葛颂) (2002) Data analysis in population genetics. I. Analysis of RAPD data with AMOVA. *Biodiversity Science* (生物多样性), **10**, 438–444. (in Chinese with English abstract)
- Zhang XP, Li XH, Qiu YX (2006) Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmate* (Saxifragaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 38–47.
- Zhang ZY (张志勇), Li DZ (李德铎) (2003) Conservation genetics of an extremely endangered pine, *Pinus squamata*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **25**, 544–550. (in Chinese with English abstract)
- Zhu H (朱华), Cai L (蔡琳) (2005) Biogeography of the tropical rain forest of Yunnan and some implications to geological history. *Advances in Earth Science* (地球科学进展), **20** (Suppl.), 1–57. (in Chinese with English abstract)

(责任编辑: 王艇 责任编辑: 时意专)