



# 宝兴百合与匍茎百合遗传多样性的 ISSR 分析

沈呈娟, 周颂东\*, 何兴金

(四川大学 生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

**摘要:** 利用 5 条 ISSR 引物对宝兴百合 (*Lilium duchartrei*) 9 个居群和匍茎百合 (*Lilium lankongense*) 13 个居群的遗传多样性进行了初步检测。结果表明: (1) 宝兴百合在物种水平上多态位百分率 (PPB) 为 97.26%, Nei's 基因多样性 ( $H$ ) 为 0.3098, Shannon's 多样性信息指数 ( $H_{sp}$ ) 为 0.4694; 匍茎百合在物种水平上多态位百分率 (PPB) 为 100%, Nei's 基因多样性 ( $H$ ) 为 0.3390, Shannon's 多样性信息指数 ( $H_{sp}$ ) 为 0.5030, 均略高于宝兴百合。(2) 宝兴百合与匍茎百合的遗传多样性在居群水平上相对较低; 宝兴百合和匍茎百合居群间遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 分别为 0.6425 和 0.5637, 表明 2 个物种居群间的遗传分化大于居群内的遗传分化。(3) 经 Mantel 检测, 两种居群间的遗传距离与地理距离均不存在显著的相关性 (宝兴百合  $r=0.2637$ ,  $P=0.8440$ ; 匍茎百合  $r=0.1042$ ,  $P=0.6950$ ); 宝兴百合与匍茎百合的遗传多样性及遗传分化现状可能是两者的生活史特性、地理隔离等作用的结果。(4) UPGMA 聚类结果显示, 宝兴百合与匍茎百合在分子水平上出现了明显分化, 支持二者是独立的物种。

**关键词:** 宝兴百合; 匍茎百合; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: Q789

文献标志码: A

## Genetic Diversity of *Lilium duchartrei* and *Lilium lankongense* Revealed by ISSR Markers

SHEN Chengjuan, ZHOU Songdong\*, HE Xingjin

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** The genetic diversity of 9 populations of *Lilium duchartrei* and 13 populations of *Lilium lankongense* was analyzed by inter-simple sequence repeat makers (ISSR). (1) For *L. duchartrei*, the percentage of polymorphic loci (PPB) at the species level, Nei's gene diversity ( $H$ ) and Shannon's information index ( $H_{sp}$ ) was found to be 97.26%, 0.3098 and 0.4694, respectively, whereas for *L. lankongense*, the three indices were found to be 100%, 0.3390 and 0.5030, respectively, all higher than that of *L. duchartrei*'s. (2) There existed little lower genetic variation at population level. The coefficient of genetic differentiation among populations ( $G_{st}$ ) was 0.6425 for *L. duchartrei* and 0.5637 for *L. lankongense*, suggesting that for both species there is a high genetic differentiation among populations. (3) Both of *L. duchartrei* and *L. lankongense*, the Mantel test showed no significant correlation between genetic and geographic distances. The genetic diversities and the current genetic differentiation of *L. duchartrei* and *L. lankongense* might have resulted from combined effects, including those of life history traits and geographical isolation. (4) UPGMA analysis show significant genetic differentiation between *L. duchartrei* and *L. lankongense* at molecular level, supporting the view that they are separate species.

**Key words:** *Lilium duchartrei*; *Lilium lankongense*; ISSR; genetic diversity

收稿日期: 2014-03-11; 修改稿收到日期: 2014-04-30

基金项目: 国家自然科学基金 (31100161, 31270241); 国家基础条件平台教学标本资源共享平台 (<http://mnh.scu.edu.cn/>)

作者简介: 沈呈娟 (1989-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物系统分类方向研究。E-mail: yctescj@sina.com

\* 通信作者: 周颂东, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物分类与系统进化相关方面研究。E-mail: songdongzhou@aliyun.com

宝兴百合 (*Lilium duchartrei*) 和匍茎百合 (*Lilium lankongense*) 隶属于百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*), 为中国特有种。两者均具走茎, 叶散生, 形态上十分相似, 在较早的研究中宝兴百合和匍茎百合被作为同一个物种处理, 命名为宝兴百合<sup>[1]</sup>。而《Flora of China》将宝兴百合和匍茎百合作为 2 个单独成立的种处理, 书中描述宝兴百合花被片白色, 有紫色斑点; 而匍茎百合花被片为粉红色, 具深红色斑点<sup>[2]</sup>。宝兴百合与匍茎百合具有明显的地理间断, 大致以四川和云南交界的大雪山为界, 分布于大雪山以北至甘肃南部地区的类群为宝兴百合, 而分布于大雪山以南的云南和西藏东南部地区的类群则为匍茎百合<sup>[3]</sup>。前人对宝兴百合和匍茎百合的细胞核型<sup>[4-5]</sup>、花粉形态<sup>[6]</sup>、叶表皮微形态<sup>[7]</sup>等方面均有过研究。核型研究表明, 宝兴百合居群间存在核型多型性, 种内分化比较剧烈<sup>[4]</sup>。较早的研究中宝兴百合和匍茎百合被作为同一个物种处理, 而对两者在分子水平上的系统发育与生物地理学研究中, 基于 ITS 序列系统发育树上这 2 个种构成单一的一支, 在 2 个种多个居群的系统发育分析表明 2 个种在分子水平上具有严格的界限。但在叶绿体的系统发育树上, 这 2 个种虽然都属于 *Lophophorum* 分

支, 但并不成姊妹类群关系, *matK* 的时间估算表明宝兴百合分化的时间要早于匍茎百合<sup>[8]</sup>。而从居群生物学角度, 按照个体取样, 对形态近似且分子系统发育亲缘关系密切的近缘种间在居群水平的遗传多样性、基因交流等的相关研究尚未见报道。

ISSR 是一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记, 采用 17~22 碱基的重复锚定引物扩增重复序列之间的片段, 在品种鉴定、亲缘关系和遗传多样性分析、DNA 指纹图谱绘制、进化及分子生态学研究领域广泛应用<sup>[9]</sup>。本实验运用 ISSR 分子标记对形态上近似分子系统发育关系具有紧密亲缘关系的不同居群的宝兴百合和匍茎百合在 DNA 水平的差异和分化进行研究, 以期揭示 2 个种的遗传多样性水平和遗传结构, 为探讨 2 个种之间的进化和分化机制及时间等关系提供资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验材料均采自野外, 并将各居群引种栽培于实验室花盆中, 凭证标本存放于四川大学植物标本馆 SZ(表 1)。本研究材料按居群采样, 个体间相距 5 m 以上。野外采集植物幼嫩叶片, 用硅胶及时干

表 1 材料来源

Table 1 Source of materials

物种 Species	居群编号 Population code	采集地 Location	经度/纬度 Longitude/Latitude	样本数 No. of samples	凭证标本 Voucher
宝兴百合 <i>L. duchartrei</i>	JZ	四川九寨 Jiuzhai, Sichuan	104°14.634'E, 33°15.138'N	2	20110629
	MEK	四川马尔康 Maerkang, Sichuan	102°12.375'E, 31°54.341'N	6	G08022
	BX	四川宝兴 Baoxing, Sichuan	102°48.876'E, 30°22.086'N	5	20120824
	LX	四川理县 Lixian, Sichuan	103°10.009'E, 31°26.196'N	9	20120819
	JJS	四川夹金山 Jiajinshan, Sichuan	102°38.940'E, 30°52.206'N	4	20110802
	JC	四川金川安宁乡 Anning, Jinchuan	102°02.916'E, 31°17.328'N	4	20120822
	XJX	四川小金县日隆镇 Rilong, Xiaojin	102°49.806'E, 30°59.634'N	5	20120823
	HS	四川黑水 Heishui, Sichuan	102°59.406'E, 32°03.738'N	4	20120818
	SP	四川松潘 Songpan, Sichuan	103°36.270'E, 32°39.348'N	5	2012081701
	匍茎百合 <i>L. lankongense</i>	XZD	云南小中甸 Xiaozhongdian, Yunnan	99°48.942'E, 27°33.192'N	5
DQ		云南德钦县 Deqin, Yunnan	98°54.678'E, 28°29.178'N	5	20120710
ZD		中甸高山植物园 Alpine Garden, Zhongdian	99°38.358'E, 27°53.796'N	5	20120707
WX		维西县雪山 Mt. Xuelong, Weixi	99°17.244'E, 27°10.572'N	5	20120704
DML		贡山县迪麻洛 Dimaluo, Gongshan	98°42.018'E, 27°56.112'N	5	20120716
XRD		中甸县仙人洞 Xianrendong, Zhongdian	99°35.520'E, 28°18.102'N	4	G2010082301
WS		中甸县格咱乡翁水村 Wengshui, Gezan	99°44.526'E, 28°12.486'N	5	S20120729
SK		中甸县石卡雪山 Mt. Shika, Zhongdian	99°42.057'E, 27°49.783'N	5	2010082401
QWD		中甸县区哇迪 Quwadi, Zhongdian	99°49.740'E, 27°31.938'N	4	2010082301
LD		丽江市鲁甸乡 Ludian, Lijiang	99°27.662'E, 27°11.392'N	5	20120703
XZ		西藏察隅县 Chayu, Xizang	97°28.140'E, 28°39.960'N	5	20110816
NX		中甸县尼西乡 Nixi, Zhongdian	99°30.408'E, 28°02.862'N	3	G2010083101
GS		贡山县黑普山 Mt. Heipu, Gongshan	98°28.182'E, 27°44.376'N	2	G2010071201

燥备用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 总 DNA 提取与检测** 采用植物基因组 DNA 试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取总 DNA。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,紫外分光光度法检测 DNA 的质量浓度,最后稀释标定到 20 ng/ $\mu$ L,放入 -20 °C 冰箱备用。

**1.2.2 ISSR 引物的筛选和 PCR 扩增** 从每个居群中随机抽选一个样本为引物筛选的模板,引物根据加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第九套引物序列(由 Invitrogne 公司合成),从中筛选稳定性好且条带清晰的引物用于正式实验的扩增。ISSR-PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L,其中含 25 ng 模板 DNA,1  $\times$  PCR Buffer,  $Mg^{2+}$  1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L,引物 0.5  $\mu$ mol/L, DNA Taq 聚合酶 1.0 U。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,51~57 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 40 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物以 Marker DL2000 作为分子量标准,用含有 Gold View 的 2% 琼脂糖凝胶于 120 V 恒压电泳 1 h。电泳结束后用凝胶成像系统仪(Bio-Rad Gel Doc XR + imaging system)进行拍照保存。

**1.2.3 数据处理与统计分析** ISSR 为显性标记,同一引物扩增产物中,电泳率一致的条带被认为同源。按照扩增产物在相对迁移位置条带的有无进行统计,有带记为“1”,无带记为“0”,强带和弱带的值均赋为“1”,构建二元数据矩阵。用 POPGENE 1.32 软件<sup>[10]</sup>分析遗传变异各项参数,包括多态位百分率( $PPB$ )、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( $H$ )、平均每个位点上的观察等位基因数( $N_s$ )、平均每个位点的有效等位基因( $N_e$ )、总的基因多样性( $H_t$ )、居群内基因多样性( $H_s$ )、居群间遗传分化系数( $G_{st}$ )、基因流( $N_m$ )、Nei's 遗传距离( $D$ )和遗传一致度( $I$ )<sup>[11-13]</sup>。另外利用 NTSYSpc 2.1 软

件<sup>[14]</sup>中的 SHAN 程序进行 UPGMA 聚类,构建树状聚类图。同时采用 AMOVA 1.55<sup>[15]</sup>软件分析遗传变异在居群内及居群间的分布情况。运用 TFP-GA 1.3 软件进行 Mantel 检测<sup>[16]</sup>,检测居群之间的遗传距离与地理距离之间的关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 宝兴百合 ISSR 结果分析

**2.1.1 宝兴百合的遗传多样性** 利用筛选的 5 个 ISSR 引物(表 2)对宝兴百合进行 PCR 扩增,所得的片段在 100~2 000 bp 之间。共计扩增出 73 个清晰可重复的有效位点,其中多态位点有 71 个。结果(表 3)显示:在物种水平上,宝兴百合的遗传多样性为  $PPB=97.26\%$ ,  $N_e=1.5211 \pm 0.3266$ ,  $H=0.3098 \pm 0.1573$ ,  $H_{sp}=0.4694 \pm 0.2024$ 。在居群水平上,各个居群的  $PPB$  为 5.48%~56.16%,平均值为 28.92%。在假设种群处于 Hardy-Weinberg 平衡条件下,9 个居群的平均有效等位基因为 1.1957,平均 Nei's 基因多样性指数为 0.1113,平均 Shannon 多样性信息指数为 0.1638,各参数值均低于物种水平。

Shannon 多样性指数显示了各居群的遗传变异由高到低依次为马尔康(MEK)>理县(LX)>松潘(SP)>金川(JC)>夹金山(JJS)>宝兴(BX)>九寨沟(JZ)>黑水(HS)>小金县(XJX),与  $PPB$  值分析的结果一致。居群间的遗传多样性参数有差异, $N_e$  最大值为  $1.3480 \pm 0.3846$ ,最小值为  $1.0400 \pm 0.1736$ ;  $H$  最大值为  $0.2013 \pm 0.2042$ ,最小值为  $0.0227 \pm 0.0962$ ,表明宝兴百合居群之间存在着一定的遗传差异。

**2.1.2 宝兴百合居群的遗传分化与基因流** 用 POPGENE 1.32 软件计算出 9 个居群  $H_t$  为 0.3114,  $H_s$  为 0.1113,  $G_{st}$  为 0.6425(表 4),即 64.25% 的变异存在于居群之间,35.75% 的遗传变异存在于居群内,居群间的遗传分化大于居群内的分化。居群之间每一代的基因流( $N_m$ )为 0.2782,这表明居群之间的基因流水平较低。

利用 AMOVA 1.55 软件分析,表明在总的遗传变异中,有 52.71% ( $P < 0.001$ ) 的遗传变异发生在居群之间,47.29% 的遗传变异存在于居群内(表 5),此结果与 POPGENE 的分析结果一致,均表明遗传变异主要存在居群间。

**2.1.3 宝兴百合居群间的遗传一致度和遗传距离分析** 用 POPGENE 计算出宝兴百合 9 个居群两

表 2 ISSR 引物序列

Table 2 Primers used for ISSR amplification

引物 Primer	引物序列 Sequence of primer	退火温度 Annealing temperature/°C
UBC835	(AG) <sub>8</sub> YC	54.1
UBC844	(CT) <sub>8</sub> RC	53.3
UBC846	(CA) <sub>8</sub> RT	51.7
UBC855	(AC) <sub>8</sub> YT	56.0
UBC873	(GACA) <sub>4</sub>	51.7

Note: Y=C/T; R=A/G.

表 3 宝兴百合与匍茎百合居群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *L. duchartrei* and *L. lankongense* populations

物种 Species	居群编号 Population code	$N_a$	$N_e$	$H$	$H_0$	PPB/%
宝兴百合 <i>L. duchartrei</i>	JZ	1.178 1±0.385 2	1.125 9±0.272 4	0.073 8±0.159 6	0.107 7±0.233 0	17.81
	MEK	1.561 6±0.499 6	1.348 0±0.384 6	0.201 3±0.204 2	0.300 2±0.290 7	56.16
	BX	1.246 6±0.434 0	1.171 7±0.334 1	0.096 4±0.179 6	0.141 1±0.257 5	24.66
	LX	1.479 5±0.503 0	1.315 0±0.370 5	0.182 8±0.205 8	0.269 7±0.296 9	47.95
	JJS	1.274 0±0.449 1	1.194 1±0.347 7	0.109 2±0.187 1	0.159 7±0.268 8	27.40
	JC	1.315 1±0.467 8	1.222 5±0.374 8	0.123 5±0.195 6	0.180 7±0.279 0	31.51
	XJX	1.054 8±0.229 2	1.040 0±0.173 6	0.022 7±0.096 2	0.033 0±0.139 2	5.48
	HS	1.150 7±0.360 2	1.110 0±0.286 0	0.060 8±0.151 7	0.088 5±0.217 1	15.07
	SP	1.342 5±0.477 8	1.234 4±0.374 0	0.131 5±0.197 4	0.193 2±0.282 1	34.25
	平均值 Average	1.289 2	1.195 7	0.111 3	0.163 8	28.92
物种水平 At species level	1.972 6±0.164 4	1.521 1±0.326 6	0.309 8±0.157 3	0.469 4±0.202 4	97.26	
匍茎百合 <i>L. lankongense</i>	XZD	1.320 5±0.469 7	1.218 4±0.365 0	0.122 4±0.193 6	0.179 9±0.276 7	32.05
	DQ	1.128 2±0.336 5	1.089 7±0.263 8	0.049 4±0.138 5	0.072 3±0.197 8	12.82
	ZD	1.423 1±0.497 2	1.316 6±0.410 9	0.174 3±0.216 5	0.252 4±0.307 2	42.31
	WX	1.666 7±0.474 5	1.441 8±0.394 8	0.251 8±0.204 6	0.371 7±0.287 9	66.67
	DML	1.410 3±0.495 1	1.260 8±0.378 4	0.148 5±0.199 0	0.220 9±0.284 5	41.03
	XRD	1.397 4±0.492 5	1.251 1±0.365 2	0.145 3±0.195 0	0.216 5±0.281 2	39.74
	WS	1.512 8±0.503 1	1.345 4±0.384 1	0.198 7±0.208 1	0.292 6±0.298 9	51.28
	SK	1.500 0±0.503 2	1.361 4±0.416 7	0.200 4±0.217 4	0.291 9±0.308 0	50
	QWD	1.153 8±0.363 1	1.074 8±0.206 8	0.047 2±0.119 5	0.073 7±0.180 5	15.38
	LD	1.435 9±0.499 1	1.378 6±0.451 2	0.199 6±0.233 1	0.282 7±0.327 5	43.59
	XZ	1.525 6±0.502 6	1.363 2±0.405 0	0.204 4±0.213 4	0.299 8±0.303 1	52.56
	NX	1.269 2±0.446 4	1.175 8±0.321 6	0.102 4±0.176 7	0.151 9±0.257 4	26.92
	GS	1.166 7±0.375 1	1.117 9±0.265 2	0.069 0±0.155 4	0.100 8±0.226 8	16.67
	平均值 Average	1.377 7	1.261 2	0.147 2	0.215 9	37.77
物种水平 At species level	2.000±0.000	1.595 3±0.343 2	0.339 0±0.163 1	0.503 0±0.207 7	100	

表 4 宝兴百合、匍茎百合居群多样性 Nei's 分析

Table 4 Nei's analysis of gene diversity in *L. duchartrei* and *L. lankongense* populations

物种 Species	$H_t$	$H_s$	$G_{st}$	$N_m$
宝兴百合 <i>L. duchartrei</i>	0.311 4±0.023 6	0.111 3±0.005 5	0.642 5	0.278 2
匍茎百合 <i>L. lankongense</i>	0.337 4±0.027 3	0.147 2±0.006 1	0.563 7	0.387 0
宝兴百合与匍茎百合种间 Among species	0.345 1±0.023 1	0.128 0±0.003 9	0.629 2	0.294 7

注:  $H_t$ , 总基因多样性;  $H_s$ , 居群内基因多样性;  $G_{st}$ , 基因分化系数;  $N_m$ , 基因流。

Note:  $H_t$ , Total gene diversity;  $H_s$ , Gene diversity within populations;  $G_{st}$ , Coefficient of gene differentiation;  $N_m$ , Gene flow;  $N_m = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$  [17].

两居群的 Nei's 遗传一致度 ( $I$ ), 范围为 0.612 3~0.854 2, 遗传距离 ( $D$ ) 范围为 0.157 6~0.490 5 (表 6)。马尔康 (MEK) 和宝兴 (BX) 居群间遗传一致度最高 ( $I=0.854 2$ ), 遗传距离最近 ( $D=0.157 6$ ), 同时在居群聚类分析中也聚在一起; 九寨 (JZ) 与小金县 (XJX) 居群间的遗传一致度最低 ( $I=0.612 3$ ), 遗传距离也最远 ( $D=0.490 5$ ), 在 UPGMA 聚类图中各自的分支也距离最远 (图 1)。地理距离和分子遗传距离的 Mantel 检测揭示宝兴百合居群间的地

理距离和遗传距离不存在显著的相关性 ( $r=0.263 7, P=0.884 0$ )。

## 2.2 匍茎百合 ISSR 结果分析

### 2.2.1 匍茎百合的遗传多样性

对匍茎百合所有居群进行扩增, 所得的片段同样在 100~2 000 bp 之间 (部分结果如图 2 所示)。共检测到 78 个清晰可重复的有效位点, 其中多态位点 78 个。与宝兴百合类似, 匍茎百合遗传多样性水平在物种和居群 2 个层面表现不同 (表 3), 在物种水平上, 匍茎百合的

表 5 宝兴百合、匍茎百合的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) of *L. duchartrei* and *L. lankongense* based on ISSR data

变异来源 Source of variation	方差总和 Sum of squares	平均方差 Mean square	变异组分 Variance component	变异百分率 Percentage of total variance/%	P*	
宝兴百合 <i>L. duchartrei</i>	居群间 Among populations	302.151 5	37.769	6.621 5	52.71	<0.001
	居群内 Within population	207.916 7	5.940	5.940 5	47.29	<0.001
匍茎百合 <i>L. lankongense</i>	居群间 Among populations	397.532 8	33.128	6.253 2	41.54	<0.001
	居群内 Within population	358.450 0	7.966	7.535 4	58.46	<0.001
宝兴百合与匍茎百合种间 Among species	123.988 3	123.988	1.709 3	11.50	<0.001	
种内居群间 Among populations within species	699.684 3	34.984	6.079 5	40.89	<0.001	
居群内 Within population	566.366 7	7.080	7.079 5	47.62	<0.001	

注:P. 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。

Note: 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 6 宝兴百合 9 个居群间的 Nei's 遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Table 6 Nei's gene identity(above diagonal) and genetic distance(below diagonal) of 9 *L. duchartrei* populations

居群编号 Population code	JZ	MEK	BX	LX	JJS	JC	XJX	HS	SP
JZ	—	0.814 2	0.767 5	0.735 9	0.628 0	0.641 8	0.612 3	0.737 2	0.765 1
MEK	0.205 5	—	0.854 2	0.786 0	0.747 4	0.769 9	0.726 5	0.729 7	0.804 2
BX	0.264 6	0.157 6	—	0.768 8	0.708 6	0.744 6	0.752 6	0.760 6	0.833 3
LX	0.306 6	0.240 8	0.262 9	—	0.820 5	0.778 2	0.707 3	0.783 6	0.773 3
JJS	0.465 1	0.291 1	0.344 4	0.197 8	—	0.832 3	0.665 0	0.704 9	0.699 9
JC	0.443 5	0.261 5	0.295 0	0.250 8	0.183 6	—	0.714 9	0.706 7	0.717 0
XJX	0.490 5	0.319 4	0.284 2	0.346 3	0.407 9	0.335 6	—	0.755 0	0.776 5
HS	0.304 9	0.315 1	0.273 7	0.243 8	0.349 7	0.347 1	0.281 1	—	0.825 5
SP	0.267 8	0.217 9	0.182 4	0.257 1	0.356 8	0.332 6	0.253 0	0.191 8	—

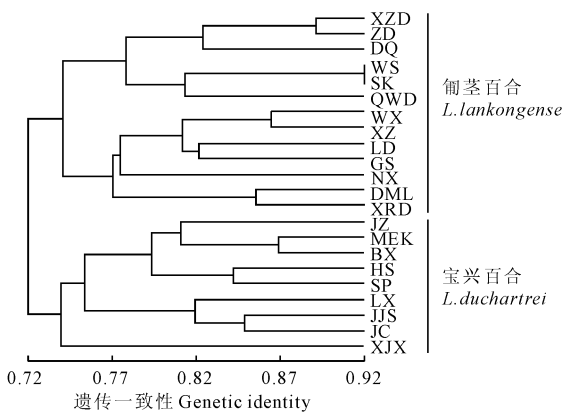


图 1 宝兴百合和匍茎百合居群的 UPGMA 聚类图  
居群编号同表 1

Fig. 1 UPGMA dendrogram of *L. duchartrei* and *L. lankongense*

Populations codes are given in Table 1

PPB 为 100%,显示了极高的遗传多样性水平,  $N_e = 1.595 3 \pm 0.343 2$ ,  $H = 0.339 0 \pm 0.163 1$ ,  $H_{sp} = 0.503 0 \pm 0.207 7$ 。在居群水平上,多态位百分率在 12.82%~66.67%之间,平均为 37.77%,遗传多

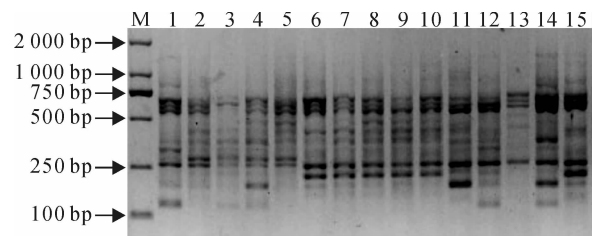


图 2 引物 835 对匍茎百合样品的扩增结果

1~5. 小中甸居群;6~10. 德钦居群;11~15. 中甸居群

Fig. 2 ISSR bands of *L. lankongense* amplified with primer 835  
1~5. XZD population; 6~10. DQ population; 11~15. ZD population  
多样性水平偏低。其中多态性位点最高的是维西居群 66.67%,而德钦居群的多态位百分率仅 12.82%。在居群水平上各参数值偏低,13 个居群的平均有效等位基因为 1.261 2,平均 Nei's 基因多样性指数为 0.147 2,平均 Shannon 多样性信息指数为 0.215 9。

Shannon 多样性指数与 PPB 值分析的结果(表 3)一致,维西居群的遗传变异最大。各居群间的遗传多样性差别较大,其中维西居群(WX)的遗传多样性水平最高(PPB=66.67%,  $N_e = 1.441 8$ ,  $H =$

0.251 8,  $H_0 = 0.371 7$ ), 德钦居群(DQ)的遗传多样性水平最低( $PPB = 12.82\%$ ,  $N_e = 1.089 7$ ,  $H = 0.049 4$ ,  $H_0 = 0.072 3$ )。

**2.2.2 匍茎百合居群的遗传分化与基因流** POPGENE 分析结果表明(表4): 13个居群的  $H_i$  为 0.337 4,  $H_s$  为 0.147 2,  $G_{st}$  为 0.563 7, 基因流( $N_m$ ) 为 0.387 0。基因流小于1, 说明居群间基因流动程度较低, 居群间遗传分化系数为 0.563 7, 揭示了居群间存在明显的遗传分化。

AMOVA 分析结果进一步表明(表5), 总变异中, 41.54% ( $P < 0.001$ ) 出现在居群间, 进而说明匍茎百合居群间也发生了较大程度的遗传分化。

**2.2.3 匍茎百合聚类分析** 根据 Nei's 遗传相似性系数, 用 NTSYSpc 2.1 软件对匍茎百合 13 个居群进行 UPGMA 聚类分析, 13 个居群按照遗传一致度高低和遗传距离远近分为 2 个大类 4 个亚类(图1)。翁水(Ws)和石卡(SK)居群遗传一致度最高, 遗传距离最近, 首先聚在一起, 而后与区哇迪(QWD)居群聚为一类; 小中甸(XZD)、中甸(ZD)和德钦(DQ)居群间的遗传一致度也较高, 也较先聚类; 迪麻洛(DML)和仙人洞(XRD)居群在与其他居群聚类前优先聚为一支; 2 个大类在 0.73 阈值处聚在一起。地理距离和分子遗传距离的 Mantel 检测揭示匍茎百合居群间的地理距离和遗传距离不存在显著的相关性( $r = 0.104 2$ ,  $P = 0.695 0$ )。

用 POPGENE 1.32 软件计算出宝兴百合 9 个居群和匍茎百合 13 个居群间的总基因多样性为 0.345 1, 居群内基因多样性为 0.128 0, 遗传分化系数( $G_{st}$ ) 为 0.629 2(表4), 说明大部分变异存在于居群间。宝兴百合与匍茎百合种间的基因流( $N_m$ ) 为 0.294 7, 这表明两者种群之间缺乏有效的基因流。宝兴百合与匍茎百合种间的 AMOVA 分析结果见表5。2 个种间的变异百分率为 11.50%, 小于种内居群间的变异百分率 40.89%。

### 3 讨论

#### 3.1 遗传多样性

遗传多样性是一个物种生存、发展和进化的基础。宝兴百合和匍茎百合居群水平的遗传多样性明显低于 Nybom<sup>[18]</sup> 基于 RAPD、ISSR、AFLP 等分子标记所统计的多种植物居群水平遗传多样性的平均值( $H = 0.22$  或  $0.23$ ), 表明宝兴百合和匍茎百合种下居群内部的遗传多样性均明显不足。相对而言, 这两个种均在物种水平上还保存着较高的遗传多样

性。Weller 等<sup>[19]</sup> 研究 *Schiedea* 属和 *Alsinidendron* 属的 29 种植物的遗传多样性, 结果表明异型花植物的遗传多样性显著高于自花授粉植物。Nybom 等<sup>[20]</sup> 认为寿命长、异交、演替阶段晚期的类群拥有较高的遗传多样性。宝兴百合和匍茎百合两性, 通过野外观察, 这 2 个种在开花时并不存在雌雄蕊异熟或异位的情况, 本朵花或本植株不同花的花粉有可能落于本朵花或本植株不同花的雌蕊柱头上, 从花色或蜜腺的存在方面看来, 这 2 个种应为虫媒传粉, 而虫媒传粉理论上应使得两者具有较高的居群遗传多样性。但本实验 ISSR 研究表明, 两者的遗传多样性在居群水平上相对较低, 原因是多方面的, 但多少与在自然界中这 2 个种均存在大量的鳞茎和走茎有关, 宝兴百合和匍茎百合为多年生植物, 这 2 个种均可以通过鳞茎和走茎进行无性繁殖, 有利于维持居群奠基者效应。另外, 百合可以食用也可以用来作为药材, 并且百合花大而美丽, 可以引种栽培为观赏花卉, 因而在实验样品收集中, 时常可见到百合属植物因遭受人为的干扰和破坏而使得居群数量和居群内个体数量减少现象, 进一步导致分布范围变小, 遗传基础趋于一致, 导致了宝兴百合和匍茎百合在居群水平上遗传多样性相对较低。

#### 3.2 宝兴百合与匍茎百合种下居群间的遗传分化

宝兴百合和匍茎百合种下居群间的遗传分化系数高于 Nybom<sup>[18]</sup> 所统计的植物 ISSR 遗传分化系数的平均值( $G_{st} = 0.34$ ), 也高于紫斑百合(*Lilium nepalense*) ( $G_{st} = 0.23$ )<sup>[21]</sup>、青岛百合(*Lilium tsingtauense*) ( $G_{st} = 0.144$ )<sup>[22]</sup> 的 ISSR 遗传分化系数, 这说明宝兴百合和匍茎百合种下居群间出现了较高的遗传分化, 可能已经形成异质居群结构。繁育系统、分布范围、种子传播机制、演替阶段等因素均能影响群体遗传结构, 异交类型植物的群体间的分化值一般较小<sup>[23]</sup>。Bussel<sup>[24]</sup> 对 35 个物种进行 RAPD 标记分析, 发现 29 个远交物种的居群间变异在总遗传变异中平均占 19.3%, 而 6 个近交物种的平均  $G_{st}$  为 0.625。宝兴百合和匍茎百合居群间的遗传分化系数明显高于远交植物, 这种遗传结构证明宝兴百合和匍茎百合具有复杂的兼性生殖繁育系统。宝兴百合和匍茎百合在自然环境中有大量鳞茎和走茎存在, 并且在野外实验样品采集过程中观察发现, 这 2 个种既存在种子实生苗, 也存在大量的无性生殖植株。即宝兴百合和匍茎百合在物种进化过程中, 因环境压力, 已经选择了适应自然生存环境的有性生殖和无性生殖的繁育制度。一方面, 这 2 个种既可

以通过种子进行有性生殖,种子借助风力传播较远距离,从而占据新的生存环境,以扩大种群的生存空间,并使物种形成居群。另一方面,野外调查发现这 2 个种能够形成较长的走茎,走茎上具有多个鳞茎,通过鳞茎进行无性繁殖,与不具有走茎的其他百合属植物相比,宝兴百合和匍茎百合的无性繁殖能力明显增强,使得母株周围长出与其基因型相同的植株,导致宝兴百合与匍茎百合居群内的遗传多样性降低。

宝兴百合和匍茎百合通过虫媒传粉,虽然虫媒传粉一般使居群间遗传分化下降,但本研究所选用的居群采自横断山区,本地区地理位置特殊,气候多变,生境多样化,且具有怒江、澜沧江等水系,居群间的地理距离大,SUN 等<sup>[25]</sup>研究发现匍茎百合的传粉昆虫主要为欧洲粉蝶和大绢斑蝶,蜜蜂和大黄蜂等一些小型昆虫也能与花接触,但是它们并不能够接触到花的生殖器官,这些小型昆虫不能够达到授粉的目的,主要靠飞行能力弱的昆虫传粉的方式阻碍了居群间基因交流,也是造成宝兴百合和匍茎百合种下居群间遗传分化值高的一个原因。

另外,宝兴百合和匍茎百合种下居群间分化较高,可能是基因流和遗传漂变两种力量相互作用的结果。这 2 个种的基因流( $N_m$ )分别为 0.278 2 和 0.387 0,当  $N_m < 1$ ,遗传漂变可以导致居群间明显的遗传变化<sup>[26]</sup>,这意味着遗传漂变很可能主导了宝兴百合和匍茎百合种下自然居群间的遗传分化,居群遗传距离与地理距离之间的 Mantel 检验不存在显著的相关性也说明了这一点。

### 3.3 宝兴百合与匍茎百合的关系问题

为了进一步表明 2 个种种间的关系,笔者利用 Nei's 遗传距离,利用非加权配对算术平均法(UP-GMA),用 PHYLIP Version 3.5 软件得出宝兴百合和匍茎百合种间各群体间遗传相似度和遗传距离。种间各群体间的遗传一致度  $I$  值的变化范围是 0.601 6~0.917 7;遗传距离  $D$  值的变化范围是 0.085 8~0.508 2。宝兴百合九寨居群与匍茎百合德钦居群表现出最大的遗传距离。

基于 ITS 序列对百合族系统发育构建的系统发育树中指出<sup>[8]</sup>,宝兴百合和匍茎百合 2 个种单独成一支,与其它卷瓣组的类群亲缘关系较远,这说明这 2 个种的亲缘关系很近。本研究基于 ISSR 分子标记,揭示了宝兴百合和匍茎百合均表现出在物种水平上具有较高的遗传多样性,且两者的种下居群间的遗传分化系数也较接近。从 ISSR 分子标记性

状所构建的系统树可以看出,两种百合各群体明显分开,群体间没有交叉现象,表明宝兴百合和匍茎百合在 DNA 分子水平上出现了明显分化,支持《Flora of China》将 2 个种单独成立的观点。

宝兴百合与匍茎百合形态近似,两者之间的亲缘关系也过于密切。根据周颂东<sup>[27]</sup>、高云东<sup>[28]</sup>、万娟<sup>[5]</sup>对百合属的核型研究中统计出 7 个宝兴百合居群和 3 个匍茎百合居群的核型,总结发现两者在染色体数目、相对大小、组成类型等各个方面均表现高度的相似性,但从次缢痕的数目和所在的染色体位置看,7 个宝兴百合居群的第二对染色体上均具有次缢痕,而匍茎百合的 3 个居群在第二对染色体上则没有次缢痕,次缢痕主要存在于近端着丝粒染色体上。除了次缢痕的数目和位置的差异外,两者的核型类型略有不同,宝兴百合的 7 个居群均为 3B 型,匍茎百合有一个居群也为 3B 型,而另外两个居群为 3A 型。从细胞分类学可以看出宝兴百合和匍茎百合的核型既有相似性又有一定的差异。

从分子系统学看,在基于 ITS 序列系统发育树<sup>[3]</sup>上宝兴百合和匍茎百合单独成一支,2 个种多个居群的系统发育分析表明 2 个种在分子水平上具有严格的界限。而在叶绿体的系统发育树上,这 2 个种虽然都属于 *Lophophorum* 分支,但并不成姊妹类群关系。根据 ITS 的结果,宝兴百合和匍茎百合这一支大概在 12.74 Mya 年前分化出来,具体到这 2 个种的分开时间则较晚,大致在 3.3 Mya 年前。而基于 *matK* 的时间估算表明宝兴百合分化的时间早于匍茎百合,大约在 5.6 Mya 年前产生。匍茎百合的出现不早于 2 Mya 年,这一结论表明匍茎百合的叶绿体基因很可能与同域分布的类群产生了杂交或基因渗透等。而叶绿体基因渗入之后,核基因仍然保持和其近缘种一致。本研究基于 ISSR 分子标记表明,多态位百分率、Nei's 基因多样性、Shannon's 多样性信息指数等指数,无论在物种水平还是在居群水平上,匍茎百合的遗传多样性均略高于宝兴百合。此外,匍茎百合在总的基因多样性和居群内基因多样性上也略高于宝兴百合。根据两者的地理分布特点以及分化时间,推测宝兴百合和匍茎百合的遗传多样性可能与第四纪冰期及其气候波动有关。

综上所述,宝兴百合与匍茎百合具有紧密的亲缘关系,虽然考虑将这 2 个种作为 2 个独立的种处理,但需要更多的证据来澄清两者之间的关系。要彻底解决宝兴百合和匍茎百合两者的关系问题,有

待于收集更多的居群和个体及增加更多的基因,综合各个分支学科的证据进行全面考虑。

### 参考文献:

- [1] 梁松筠. 中国植物志(第14卷)[M]. 北京:科学出版社,1992:196—198.
- [2] LIANG S J, MINORU N T. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 2000, 24: 135—149.
- [3] 高云东. 百合属及其近缘属植物的核型进化及百合属的分子系统学、生物地理学研究[D]. 成都:四川大学,2012.
- [4] HUANG R F(黄瑞复), LI J F(李劲峰). Karyotype and ITS differentiation studies in the four populations of *Lilium duchartrei*[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 1996, **18**(S8): 15—22(in Chinese).
- [5] WAN J(万娟), ZHOU S D(周颂东), et al. Karyotypes of twenty-five populations of thirteen species in *Nomocharis* and *Lilium*[J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), 2011, **33**(5): 477—494(in Chinese).
- [6] GU X(顾欣), ZHANG Y L(张延龙), NIU L X(牛立新). Pollen morphology observation of 15 wild Lilies from Four Provinces in Western China[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2013, **40**(7): 1 389—1 398(in Chinese).
- [7] GU L J(谷丽佳), WANG W H(王文和), ZHAO X N(赵西宁). Leaf epidermis micro-morphological character of Lily[J]. *Journal of Beijing University of Agriculture* (北京农学院学报), 2010, **25**(4): 26—31(in Chinese).
- [8] GAO Y D, ZHOU S D, HE X J, et al. Evolutionary events in *Lilium* (including *Nomocharis*, Liliaceae) are temporally correlated with orogenies of the Q-T plateau and the Hengduan Mountains[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, **68**(3): 443—460.
- [9] ZIETKIEWICZ E, RAFALAKE A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, **20**(2): 176—183.
- [10] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis (Ver. 1. 32)[M]. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada (program available from: <http://www.ualbreta.ca/~fyeh/>), 1997.
- [11] NEI M. Analysis of gene frequencies in subdivided populations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973, **70**(12): 3 321—3 323.
- [12] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, **89**(3): 583—590.
- [13] NEI M. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987: 187—192.
- [14] ROHLF F J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2. 0. Exeter Software[CP/DK]. New York, 1998.
- [15] EXCOFFIER L. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) Version 1. 55[CP/DK]. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1993.
- [16] MILLER M P. Tools for population genetic analysis (TFPGA), Version 1. 3[M]. Department of Biological Science, Northern Arizona University, Arizona, USA, 1997.
- [17] McDermott J M, McDonald B A. Gene flow in plant pathosystems[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1993, **31**(1): 353—373.
- [18] NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants[J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**(5): 1 143—1 155.
- [19] WELLER S G, SAKAI A K, STRAUB C. Allozyme diversity and genetic identity in *Schiedea* and *Alsiniidendron* (Caryophyllaceae: Alsinoideae) in the Hawaiian islands[J]. *Evolution*, 1996, **50**(1): 22—34.
- [20] NYBOM H, BARTISH I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants[J]. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2000, **3**(2): 93—114.
- [21] HE X J(何显静), LI B(李标), YU H(虞泓). The population study of *Lilium nepalense*[J]. *Journal of Yunnan University*, 2003, **25**(S): 78—83(in Chinese).
- [22] GUO W H, JEONG J, KIM Z S, et al. Genetic diversity of *Lilium tsingtauense* in China and Korea revealed by ISSR markers and morphological characters[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2011, **39**(4): 352—360.
- [23] HAMRICK J L, GODT M J W. Allozyme diversity in plant Species[M]//BROWN A H D, CLEGG M T, KAHLER A L. Plant Population genetics, Breeding, and Genetic Resources. Sunderland, Mass: Sinauer, 1990: 43—63.
- [24] BUSSEL J D. The distribution of random amplified poly-morphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae)[J]. *Molecular Ecology*, 1999, **8**(5): 775—789.
- [25] SUN S G, YAO C Y. Increased seed set in down slope-facing flowers of *Lilium duchartrei*[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2013, **51**(4): 405—412.
- [26] SLATKIN M. Gene flow in natural populations[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1985, **16**: 393—430.
- [27] 周颂东. 中国狭义百合科百合族的系统分类与进化研究[D]. 成都:四川大学,2008.
- [28] GAO Y D, ZHOU S D, HE X J. Karyotype studies in thirty-two species of *Lilium* (Liliaceae) from China[J]. *Nordic Journal of Botany*, 2011, **29**(6): 746—761.