

垂珠花自然居群表型性状及遗传多样性分析

许晓岗^{1,2}, 吴秀萍^{1,2}, 丁芳芳²

(1 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 南京 210037; 2 南京林业大学 生物与环境学院, 南京 210037)

摘要: 为探索垂珠花自然居群间表型差异的内在因素, 该研究用 14 个表型性状和微卫星分子标记法对 6 个垂珠花自然居群进行遗传多样性分析。结果表明: (1) 14 个表型性状在居群间和居群内皆存在极显著差异; 居群间平均表型分化系数(V_{st})为 22.64%, 垂珠花自然居群内的表型变异大于居群间的表型变异, 说明居群内变异是垂珠花居群的主要变异来源。(2) 4 对微卫星引物在 87 个个体上共检测到 43 个等位基因, 平均每条引物 10.63 个, 平均多态位点百分率(P)为 100%; 平均观察杂合度(H_o)和平均期望杂合度(H_e)分别为 0.659 和 0.811, Shannon 多样性指数(I)平均达 1.894; 居群内遗传多样性(H_s)高达 0.811, 居群间遗传多样性(D_{st})仅为 0.110, 居群间遗传分化系数(F_{st})为 0.118, 说明 11.8% 的遗传变异来自于居群间, 88.2% 的遗传变异来自于居群内, 与表型变异研究所得结论大体相一致。表型性状和微卫星分子标记结果均表明垂珠花自然居群存在丰富的遗传变异, 较高的基因流($N_m=2.050$)使得垂珠花居群间的遗传变异小于居群内的遗传变异。

关键词: 垂珠花; 居群; 微卫星; 表型性状; 遗传多样性

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Phenotypic Traits and Genetic Diversity of Natural Population of *Styrax dasyanthus* Perkins

XU Xiaogang^{1,2}, WU Xiuping^{1,2}, DING Fangfang²

(1 Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2 College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The object of this work was to explore the intrinsic factors of phenotypic differentiation among natural populations of *Styrax dasyanthus* Perkins. The genetic diversity of 6 natural populations of *S. dasyanthus* was analyzed by 14 phenotypic traits and microsatellite markers. The results showed that: (1) there was significant differentiation in 14 phenotypic traits among populations and within population. The mean phenotypic differentiation coefficient (V_{st}) was 22.64%, and the phenotypic variation of populations of *S. dasyanthus* within population was higher than that among populations, which indicated that the phenotypic variation mainly from variance within population. (2) a total of 43 alleles were identified in 87 individuals by 4 microsatellite primers, with a mean value of 10.63 alleles per primer and the average percentage of polymorphic loci (P) was 100%. The mean observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e), Shannon's information index (I) were 0.659, 0.811, 1.894, respectively. The genetic diversity within population (H_s) was up to 0.811, and the genetic diversity among populations (D_{st}) was only 0.110. The genetic differentiation coefficient (F_{st}) among populations was 0.118, indicating that the percentage variation among populations was 11.8%, and the percentage variation within population was

收稿日期: 2017-04-27; 修改稿收到日期: 2017-07-18

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 常熟市农业产业关键技术创新项目(CN201710)

作者简介: 许晓岗(1968—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物资源利用的研究。E-mail: xiaogangb.xu@gmail.com

88.2%, which was consistent with the conclusion of phenotypic variation research roughly. The test results of phenotypic traits and microsatellite markers showed that there was abundant genetic variation in the natural population of *S. dasyanthus*, and the higher genetic flow ($N_m=2.050$) allowed the genetic variation among populations to be less than that within population.

Key words: *Styrax dasyanthus* Perkins; population; microsatellite; phenotypic traits; genetic diversity

垂珠花(*Styrax dasyanthus* Perkins)为安息香科(*Styracaceae*)安息香属(*Styrax*)落叶小乔木,在中国江苏、河南、山东、安徽、浙江、湖北、湖南、江西和四川等地均有分布^[1]。垂珠花盛开时繁花似雪,清香优雅;叶可入药,润肺止咳;种子含半干性油,供制肥皂及油漆。由此可见,垂珠花是集观赏、药用及芳香型等一体的资源植物,具有较高的经济价值及广阔的景观应用前景,然而,迄今为止对该种的相关研究报道极少。

本研究团队通过对江苏、江西及安徽等地垂珠花的自然分布、资源量情况调查后发现,各地自然居群垂珠花在枝条、叶片、果实、种子、喙及毛被等性状存在显著表型变异。由此引出下列问题:不同地区垂珠花的表型变异属居群间还是居群内变异?其变异程度与变异规律如何?垂珠花居群内和居群间的遗传多样性的差异如何?产生这些变异的原因是什么?以及遗传变异与表型变异之间的关系怎样?现有的研究进展显示,对垂珠花自然居群的表型变异、遗传变异等方面的研究报道还很少,而以分子标记开展垂珠花的相关研究尚未见报道。

随着 DNA 分子标记技术的发展,微卫星标记是选择中性的标记方法,与其他分子标记如 RFLP、RAPD 等相比,具有多态性高、重复性好等优点^[2],可检测更多的等位基因,提供更细致的基因变化分析范围,已在居群遗传学研究中被广泛使用^[3]。为探索上述问题,本研究采用微卫星分子标记法,对不同居群垂珠花在 DNA 水平上进行遗传多样性分析,为筛选野生垂珠花居群的优良变异性状、遗传资

源的保护及引种驯化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

在江苏、江西和安徽等地区,选取了 6 个具代表性的垂珠花自然居群;利用 GPS 数据采集器记录各采样点地理经纬度;采集生长健壮、无病虫个体的一年生枝、果实、种子、成熟叶片等部位样本,每个居群的样木间距在 50 m 以上,共 87 个个体(表 1);同时采集各居群的垂珠花新鲜叶片,江苏地区内新鲜样本用冰盒采集并快速转入超低温冰箱保存,安徽和江西的样本用变色硅胶干燥法采集,注意将采集的新鲜叶片用干净的纸巾包裹好,置于自封袋中,加入硅胶轻揉使叶片与硅胶充分接触,封存后带回实验室 4 ℃ 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 表型性状的测定与统计 在垂珠花 6 个自然居群中分别随机采集树冠外围新梢、一年生发育枝和果实各 30 个。测量以下参数:①一年生枝基径;②叶片长、宽及叶的长宽比;③果实纵径、横径及长宽比(纵径/横径)、果皮厚度、喙长;④种子纵径、横径、长宽比(纵径/横径)、种皮厚度及种子的千粒重,重复 3 次,并记录数据。6 个垂珠花自然居群样本的 14 个表型性状的相关数据采用 Excel 和 SPSS17.0 统计软件进行统计与方差分析,表型分化系数(V_{st})计算方法参照赵翊^[4]的方法。

1.2.2 方差分析 对枝条围径进行单因素方差分析,对叶片长度、叶片宽度、叶片长宽比、果实纵轴长

表 1 6 个垂珠花自然居群的取样数量和地理位置

Table 1 Sampling number and locations of 6 natural populations of *S. dasyanthus*

居群号 Population ID	地点 Locality	样本数 Sample size	经纬度 Longitude and latitude
AH	安徽黄山 Huangshan, Anhui	12	118°144'E, 30°145'N
JX	江西铅山 Yanshan, Jiangxi	10	117°800'E, 27°944'N
JNS	江苏金牛山 Jinniushan, Jiangsu	12	118°994'E, 32°473'N
LS	江苏老山 Laoshan, Jiangsu	24	118°597'E, 32°097'N
QXS	江苏栖霞山 Qixiashan, Jiangsu	7	118°961'E, 32°155'N
YZS	江苏游子山 Youzishan, Jiangsu	22	119°014'E, 31°347'N

度、果实横轴长度、果实纵横比、果实喙长、果壳厚度、种子纵轴长度、种子横轴长度、种子纵横比、种皮厚度、种子千粒重等形态性状采用巢式方差分析。

线性模型: $Y_{ijk} = \mu + S_i + T_{(i)j} + \epsilon_{(ij)k}$

其中, Y_{ijk} 是第*i*个群体第*j*个单株第*k*个观测值, μ 为总均值, S_i 为群体效应(固定), $T_{(i)j}$ 为群体内家系效应(随机), $\epsilon_{(ij)k}$ 为试验误差。

表型分化系数: $V_{st}(\%) = [(\sigma_{2t/s})/(\sigma_{2t/s} + \sigma_{2s})] \times 100\%$

其中, $\sigma_{2t/s}$ 为居群间方差分量; σ_{2s} 为居群内方差分量; V_{st} 为表型分化系数,表示居群间变异占遗传总变异的百分比。 $\sigma_{2t/s} = (MS_t - MS_s)/jk$; $\sigma_{2s} = (MS_s - MS_e)/k$; 式中, MS_t 为居群间均方, MS_s 为居群内均方, MS_e 为机误均方,*j*为群体内样本数,*k*为观测重复数。

1.2.3 DNA 提取与检测 采用 CTAB-SDS 法^[5]提取垂珠花基因组 DNA,用 Mini Beadbeater-16 组织研磨器对材料进行研磨,并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计(Tanon)检测提取出的垂珠花样品 DNA 质量及浓度,选用 A_{260}/A_{280} 的比值在 1.75~1.85 之间的样本 DNA。

1.2.4 微卫星引物筛选 由于微卫星分子标记的引物的通用性较强,本实验所用引物序列从 Wang^[6]和 Yao 等^[7]引物中筛选适用于垂珠花的微卫星引物,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。将所有垂珠花样本的基因组 DNA 分别进行 PCR 扩增,扩增结果用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳来检测,具体操作步骤参照倪茂磊^[8]的方法,筛选出 13 对多态性引物,根据各引物的最适退火温度设计 PCR 反应程序并分别对各居群的所有个体进行扩

增,最终选出多态性较高、条带清晰的引物作为后续进行微卫星分析的引物(表 2)。

1.2.5 PCR 扩增 以 6 个居群中采集的 87 个样本为模板,分别与前期优化试验筛选所得引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如下(总体积 25 μ L): Template (DNA) 2 μ L, 2 $\times$ Taq master mix 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ mol/L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,42 $^{\circ}$ C~57 $^{\circ}$ C(视引物 T_m 值而定)退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 复性 30 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,最后 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物以 50 bp DNA ladder 作为分子量标记,用 1% 琼脂糖凝胶在 120 V 恒压 100 mA 电流下电泳 30 min,经银染显色,在灯箱上拍照。

1.3 数据整理与分析

微卫星标记为共显性的分子标记,所以同一对引物扩增的不同条带代表了同一基因位点上不同的等位位点。人工进行微卫星电泳的条带的读取和统计,在 Excel 表格中记录所有个体对应的带型,用大写字母 A、B、C、D 等按条带从大到小的顺序进行编号,利用双字母标记垂珠花每个位点不同的基因型,纯合基因型用相同字母(如 AA、BB 等)标记,而杂合基因型则用代表双亲等位基因的字母(如 AB、BC、CD 等)标记^[9]。以此基因型标记结果建立数据矩阵,按照 GenALEx 6.5 软件^[10]和 POPGENE 1.32 软件^[11]计算不同微卫星引物的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态位点百分率(P)、Shannon 信息指数(I)和 Nei's 多样性指数(H)等各项遗传变异参数,分析其遗传多样性、遗传分化和基因流。

表 2 垂珠花 4 对微卫星引物

Table 2 Four pairs of microsatellite primers of *S. dasyanthus*

位点 Locus	引物序列 Primer sequence(5'→3')	片段大小 Size/bp	等位基因数 Number of alleles(N_a)	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}$ C
Styr 5	ACACGCAACCCCATCTT GGTCTTCGGTTCAAGTATCT	356~392	10	57
Styr 21	AATAAAATGGCTGTCCCCTT ATGGTTAGCACTGAGATGAT	183~201	13	42
Styr 22	TTGACACACAACAACGCTAC GACAACTATGGACGAAAAC	215~229	10	57
Styr 42	GAAGCGCATAAAATCACACG CCAAACAGGGACAGGAAAC	222~248	10	57
总数 Total			43	
均值 Mean			10.63	

2 结果与分析

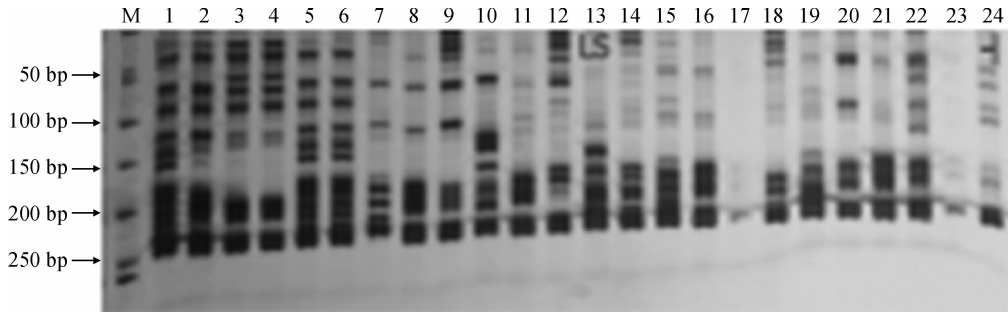
2.1 引物通用性检测

引物 Styr 42 对老山居群(LS)的样本 DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果如图 1,从老山垂珠花居群所采集的大部分样本很容易地提取到高质量的基因组 DNA,DNA 主条带清晰明显,点样孔稍有些杂质残留,但由于微卫星标记对 DNA 质量要求并

不十分严格,不会影响后续实验结果,故所提取的 DNA 基本满足扩增的需要。

2.2 居群表型性状变异及分化

6 个垂珠花居群的表型性状分析(表 3)表明,14 个参试表型性状在居群间和居群内的差异均达到极显著水平($P<0.01$),说明垂珠花的表型性状在居群间和居群内皆存在广泛的变异。由表 3 可知,不同居群的表型性状的变异系数差异较大,其中,种子



M. 50 bp DNA ladder; 1~24. LS 居群样本

图 1 部分垂珠花 DNA 检测结果

M. 50 bp DNA ladder; 1—24. Population-LS

Fig. 1 Test results of partial genomic DNA samples of *S. dasyanthus*

表 3 垂珠花自然居群表型性状分析

Table 3 The variation analysis based on phenotypic traits in natural populations of *S. dasyanthus*

部位 Parts	性状 Trait	方差分量 Variance component			F 值 F value		表型分化系数 Phenotypic differentiation coefficient (V_{st})/%
		居群间 Among populations	居群内 Within population	机误 Error	居群间 Among populations	居群内 Within population	
枝条 Branch	枝条围径 Branch circumference/cm	0.0204	0.157	0.0044	4.62 **	5.89 **	15.36
叶片 Leaf	叶长 Leaf length/cm	22.447	87.0465	0.4214	10.10 **	18.40 **	33.24
	叶宽 Leaf width/cm	32.6253	94.2276	0.3133	9.68 **	15.71 **	34.22
	长宽比 Aspect ratio	84.0324	117.354	0.7223	54.59 **	58.27 **	8.73
果实 Fruit	纵径 Length/cm	52.1743	92.1284	0.2879	17.82 **	32.15 **	25.69
	横径 Broad width/cm	30.2873	19.3789	0.6362	26.77 **	18.72 **	34.13
	纵横比 Aspect ratio	0.6738	0.7269	0.1093	8.16 **	14.71 **	19.76
	果壳厚度 Shell thickness/cm	15.3792	15.6470	0.2826	20.73 **	20.96 **	13.77
	喙长 Beak length/cm	23.3734	60.2763	0.3517	29.28 **	45.47 **	6.48
种子 Seed	纵径 Length/cm	16.4716	22.5791	0.2762	12.74 **	27.33 **	30.17
	横径 Width/cm	15.6173	7.3102	0.3985	21.24 **	13.47 **	36.55
	纵横比 Aspect ratio	0.5355	0.8643	0.0329	12.35 **	15.22 **	23.84
	种皮厚度 Pericarp thickness/cm	11.3792	16.6470	0.2521	19.39 **	23.76 **	14.66
	千粒重 Thousand seed weight/g	159.6237	170.6236	3.7349	38.66 **	43.76 **	20.30
均值 Mean							22.64

注: ** 表示在 0.01 水平上差异达到的显著性
注: ** means significant difference at 0.01 level

横径长的分化系数最高,达 36.55%,说明居群间垂珠花的种子横径长差异较大;叶片长宽比(8.73%)和果实喙长(6.48%)的分化系数相对较小,说明这两种性状在居群间变异程度较小,比较稳定。根据巢氏方差分析结果,各表型性状在垂珠花居群间表型分化系数(V_{st})的变异幅度为 6.48%~36.55%,平均表型分化系数(V_{st})为 22.64%,表明垂珠花自然居群间的表型变异为 22.64%,居群内的表型变异为 77.36%,说明居群内变异大于居群间变异,居群内表型变异是垂珠花居群变异的主要来源,居群内的表型多样性程度远较居群间丰富。

2.3 微卫星引物多态性分析

微卫星引物研究分析(表 2 和表 4)表明,4 对微卫星引物在 6 个垂珠花居群的 87 份样本上均表现出多态性,多态率为 100%,而同科植物长果秤锤树(*Sinojackia dolichocarpa*)为仅 72.99%^[12];4 对微卫星引物在 87 个个体中共检测到 43 个等位基因,平均等位基因数为 10.63 个,高于利用微卫星标记对野茉莉(5.3 个)、赛山梅(6.71 个)及同科植物秤锤树(5 个)的扩增结果^[6, 13]。这些引物的平均观察等位基因数(N_a)为 8.792,平均有效等位基因数(N_e)为 6.100,不同位点的等位基因数及有效等位基因数相差较小;平均观察杂合度(H_o)为 0.659,平

均期望杂合度(H_e)为 0.811。Styr21 检测出的 Shannon 指数(I)最大(1.990),Styr22 最小(1.746),平均值为 1.894。微卫星引物 Styr5、Styr21、Styr22 和 Styr42 的各项遗传多样性指标均比较高,表明所选引物具有良好的多态性,能有效检测垂珠花自然居群的遗传多样性。

2.4 居群遗传多样性分析

遗传多样性分析结果(表 5)显示,6 个垂珠花自然居群的观察等位基因数(N_a)为 2.375~6.500,平均为 4.396,居群的平均期望杂合度(H_e)为 0.811,平均多态位点百分比(P)为 100%。各垂珠花自然居群的 Shannon 指数为 1.350~2.245,平均 Shannon 指数达 1.894,表明垂珠花自然居群具有较高水平的遗传多样性,其遗传多样性顺序由高到低依次为:居群 LS>居群 YZS>居群 JNS>居群 AH>居群 JX>居群 QXS。从垂珠花居群水平上看,江苏南京浦口区老山居群(LS)的遗传多样性最高($N_a=6.500$; $N_e=9.164$; $H_o=0.707$; $H_e=0.884$),江苏南京栖霞区栖霞山居群(QXS)的遗传多样性最低($N_a=2.375$; $N_e=3.428$; $H_o=0.507$; $H_e=0.690$)。在 6 个居群范围内,有 4 个居群出现特有等位基因,老山居群(LS)种最多(3 个),居群 YZS 次之(2 个),居群 AH 和 JX 最少(各 1 个)。

表 4 4 个微卫星位点的遗传多样性
Table 4 Genetic diversity of four microsatellite

位点 Locus	观察等位基因数 Observed number of alleles(N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles(N_e)	Shannon 信息指数 Shannon information index(I)	观察杂合度 Observed heterozygosity(H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity(H_e)
Styr 5	8.833	5.877	1.882	0.660	0.807
Styr 21	9.333	6.825	1.990	0.769	0.833
Styr 22	7.833	5.335	1.746	0.421	0.775
Styr 42	9.167	6.364	1.959	0.785	0.830
均值 Mean	8.792	6.100	1.894	0.659	0.811

表 5 6 个垂珠花自然居群的遗传多样性
Table 5 Genetic diversity of 6 natural populations of *S. dasyanthus*

局群号 Population ID	多态位点百分比 Percentage of polymorphic loci (P)/%	观察等位基因 Observed number of alleles (N_a)	有效等位基因 Effective Number of alleles (N_e)	Shannon 信息指数 Shannon information index (I)	观察杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	特有等位基因数 Numbers of private alleles (A_{priv})
LS	100	6.500	9.164	2.341	0.707	0.884	3
QXS	100	2.375	3.428	1.350	0.507	0.690	0
YZS	100	6.125	8.019	2.245	0.774	0.872	2
JNS	100	4.375	5.881	1.951	0.647	0.829	0
AH	100	3.500	5.368	1.764	0.646	0.806	1
JX	100	3.500	4.742	1.714	0.672	0.786	1
均值 Mean	100	4.396	6.100	1.894	0.659	0.811	—

表 6 4 个位点上的 Nei's 遗传分化和基因流分析

Table 6 Nei's analysis of genetic differentiation and gene flow in 4 microsatellite loci

位点 Locus	总基因多样性 Total gene diversity (H_t)	居群内基 因多样性 Genetic diversity within population (H_s)	居群间基 因多样性 Genetic diversity among populations (D_{st})	居群间基 因分化系数 Coefficient of gene differentiation (G_{st})	F-统计量 F-statistic			基因流 Gene flow (N_m)
					内繁育系数 Inbreeding coefficient (F_{is})	近交系数 Fixation index (F_{it})	遗传分化系数 Genetic differentiation coefficient (F_{st})	
Styr 5	0.922	0.807	0.116	0.186	0.181	0.284	0.126	1.741
Styr 21	0.942	0.833	0.108	0.159	0.076	0.183	0.116	1.903
Styr 22	0.924	0.775	0.150	0.206	0.457	0.544	0.161	1.305
Styr 42	0.894	0.830	0.065	0.134	0.055	0.122	0.071	3.252
均值 Mean	0.920	0.811	0.110	0.171	0.192	0.283	0.118	2.050

注: $N_m=0.25(1-F_{st})/F_{st}$

Note: $N_m=0.25(1-F_{st})/F_{st}$

2.5 居群遗传分化与基因流分析

垂珠花自然居群在 4 个微卫星位点的遗传分化结果(表 6)显示,6 个垂珠花自然居群的总基因多样性(H_t)高达 0.920;居群内基因多样性(H_s)为 0.811,明显高于居群间基因多样性($D_{st}=0.110$),且为后者的 7.37 倍。居群间基因分化系数(G_{st})为 0.171,高于其它风媒种的基因分化系数($G_{st}=0.099$)^[14]。由 Nei's 指数计算的 6 个垂珠花居群的遗传分化系数(F_{st})在 7.1% (Styr 42)~16.1% (Styr 22)之间,平均值为 11.8%,接近 G_{st} 的值,说明垂珠花居群的遗传分化水平较低,垂珠花的遗传变异主要来自于居群内(居群间变异为 11.8%,居群间变异为 88.2%)。由表 6 可知,各位点上的近交系数(F_{it})在 0.122~0.544 间,说明居群内存在一定程度的近交。在 F_{st} 值的基础上估算垂珠花自然居群间的基因流(N_m)于不同位点在 1.305 (Styr 22)~3.152 (Styr 42)之间浮动,平均值为2.050,表明了不同居群间的垂珠花基因流处于较高水平,可能是不同垂珠花居群遗传分化程度低的重要原因^[15]。

3 讨 论

3.1 表型变异及遗传多样性

表型性状既表现出物种的变异性又显示其稳定性,这是因为表型变异是物种遗传变异在形态水平上的表现形式,是基因型和环境条件共同作用的结果^[16]。6 个自然居群的垂珠花在居群间和居群内的表型变异颇为丰富,均表现为极显著差异,说明垂珠花对生境的适应范围较广泛,不同地区居群为适应环境需要产生不同的表型^[17]。14 个参试性状的平均表型分化系数(V_{st})为 22.64%,说明居群内变

异是垂珠花的主要变异来源,且居群内的变异程度远较居群间丰富。这是由于 6 个垂珠花自然居群均处于亚热带,地理跨度相对较小,从江西到江苏,采样点的温度、无霜期和降水量等气候因子变化幅度相对较小,且垂珠花的分布呈零星状态,居群内存在的近交现象和居群间频繁的基因交流,使得垂珠花自然居群内的变异较大,而居群间的变异则相对较小。而本研究结果却与柳新红^[18]的研究结论有所偏差:柳新红在白花树(越南安息香)自然群体遗传多样性时发现,白花树的平均表型分化系数(V_{st})为 59.08%,其居群间的多样性程度大于居群内的多样性,表型变异以居群间变异为主,这可能与其采样点的地理跨度和生境条件有关。

Hamrick 等^[19]总结了 322 种木本植物的遗传结构,认为广布、异交且种子随风传播或鸟兽取食的木本植物,其群体内的遗传多样性比群体间更丰富。本研究发现 6 个垂珠花自然居群的遗传多样性水平较为丰富($N_a=8.792$; $N_e=6.100$; $H_o=0.659$; $H_e=0.811$),居群内总体水平的近交指数较低($F_{it}=0.283$),推测与其自然分布和生活史有关:一方面,野生垂珠花的地理分布较广,其分布区在气候、土壤、植被等生态因子上具有很大的差异性,导致各垂珠花居群间为适应不同的环境产生较大的变异;另一方面,垂珠花的花洁白芳香而繁盛,属虫媒花,由此,推断垂珠花的交配系统主要为异交。Nyborm 等^[20]用 RAPD 分子标记检测植物的遗传结构时发现,自交种、混交种和异交种的遗传分化系数分别是 0.59、0.19 和 0.213。本研究通过微卫星分子标记法发现垂珠花自然居群间的遗传分化系数(F_{st})为 0.118,接近 Nyborm 等研究的结果。垂珠花果实为核果,进行种子繁殖,果实成熟后自然开裂

脱落,其种子含油量高且营养丰富,鸟兽喜食,这可能会对种子的扩散速率和远距离传播有利,为垂珠花提供远距离基因交流的带来了可能性,也解释了其遗传多样性丰富的原因。

3.2 居群遗传分化与基因流

物种的种子传播机制、繁育系统和自然分布等一系列进化因子都可影响该物种的遗传结构,但在异交类型植物中群体间的分化值一般较小^[19],而遗传分化系数是分析物种内遗传结构的重要参数^[21]。Wright^[22]认为 F_{st} 为 0~0.05 时,群体间的遗传分化很小; F_{st} 为 0.05~0.15,群体间存在中等程度的遗传分化; F_{st} 为 0.15~0.25,群体间遗传分化较大; F_{st} 为 0.25 以上,群体间有很大的遗传分化。本实验中,微卫星标记检测得出 6 个垂珠花自然居群间的平均遗传分化系数(F_{st})为 0.118,可认为其居群间的遗传分化程度为中等,且大部分(88.2%)的遗传变异来自于居群内,居群内的变异大于居群间的变异,这与表型研究所得结论相一致,但 6 个居群在 14 个表型上的分化系数($V_{st}=22.64\%$)远高于基因分化系数($F_{st}=0.118$),说明垂珠花的遗传多样性受环境因子的影响更大。同科植物长果安息香(*Changiostyrax dolichocarpa*)^[23]的微卫星分子标记研究发现,濒危植物长果安息香仍保持着较高的遗传多样性,且遗传分化系数(F_{st})为 0.064,93.94%的遗传变异存在于居群内(AMOVA 分析),虽然具体数据有所差异,但所得结论与本实验所得结论一致,即居群间遗传分化属中等程度,居群内的变异大于居群间的变异。

基因流是影响群体内部和群体之间遗传变异程度的重要因素,在一定程度上可反映居群间遗传物质的交流状况^[24]。本实验中,垂珠花居群间的遗传分化较小($F_{st}=0.118$),基因流($N_m=2.050$)较高,高于虫媒异交种基因流($N_m=1.154$)^[25],亦略高于一般广布种植物的基因流($N_m=1.881$),但明显低于一般风媒传粉植物的基因流($N_m=5.240$)^[14]。Wright^[26]和 Slatkin^[27]均认同 $N_m>1$ 的物种,基因流可以抵制居群间由遗传漂变引起的遗传分化,以维持居群间的遗传多样性,防止近交衰退^[28],这表明影响垂珠花 6 个居群遗传结构的主要因素可能是基因流($N_m=2.050$),而花粉和种子的扩散是植物基因流主要两种形式^[29]。垂珠花盛花期时开花量大,芬芳清香,可借助风媒和虫媒进行较远距离的花粉传播;此外,垂珠花的种子特性使得动物为其远距离传播提供条件,这可能是其居群间基因交流的方式^[30-31]。

3.3 资源利用与保护策略

垂珠花的野生居群遗传多样性水平较为丰富,且居群间和居群内均存在广泛的遗传变异,说明垂珠花对环境适的应性较为广泛,具有较强的进化潜能。对于遗传多样性较高的垂珠花居群,应充分重视居群内不同类型的个体进行筛选,并按不同资源利用的目标分别引种栽培,加快对其进行大规模繁育技术研究,为后续安息香属植物资源的保护、利用和评价奠定良好基础。此外,应就地保护现有野生垂珠花个体数量以维护居群的完整性,在适当开发利用的同时防止乱采滥伐。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志(第 60 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 116.
- [2] 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] 王滑. 我国核桃 10 个居群的遗传多样性分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- [4] 赵翮, 赵树进. 白木香群体的表型多样性分析[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2007, **35**(4): 117-122.
ZHAO X, ZHAO S J. Phenotypic diversity of different *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng. populations[J]. *Journal of South China University of Technology* (Nat. Sci. Edi.), 2007, **35**(4): 117-122.
- [5] DOYLE J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, **19**(1): 11-15.
- [6] WANG X Y, YU S, LIU M, *et al.* Twenty-three microsatellite loci for *Styrax confusus* and *Styrax japonicus* (Styracaceae)[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2010, **2**(1): 51-54.
- [7] YAO X H, YE Q G, KANG M, *et al.* Characterization of microsatellite markers in the endangered *Sinojackia xylocarpa* (Styracaceae) and cross-species amplification in closely related taxa[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, **6**(1): 133-136.
- [8] 倪茂磊. 美洲黑杨遗传多样性分析与核心种质库构建[D]. 南京: 南京林业大学, 2011.
- [9] 郝丽娟. 能源植物黄连木遗传多样性的 SSR 及 ISSR 分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [10] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update [J]. *Bioinformatics*, 2012, **28**(19): 2 537-2 539.

[11] YE H F, YANG R, BOYLE T. POPGENE Version 1.32 Microsoft Windows-based Freeware for Populations Genetic Analysis[M]. Canada: University of Alberta, Edmonton, 1999.

[12] CAO P J, YAO Q F, DING B Y, *et al.* Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR)[J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2006, **34**(3): 231-239.

[13] ZHANG J J, YE Q G, YAO X H, *et al.* Microsatellite diversity and mating system of *Sinojackia xylocarpa* (Styracaceae), a species extinct in the wild[J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2010, **38**(2): 154-159.

[14] BROWN A H D, CLEGG M T, KAHLER A L, *et al.* Plant population genetics, breeding, and genetic resources[J]. *Bioscience*, 1990, **41**(1): 613-614.

[15] 张玲, 焦培培, 李志军. 中国新疆灰叶胡杨群体遗传多样性的 SSR 分析[J]. 生态学报, 2012, **31**(11): 2 755-2 761.

ZHANG L, JIAO P P, LI Z J. Genetic diversity of *Populus pruinosa* populations in Xinjiang of China based on SSR analysis[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(11): 2 755-2 761.

[16] 刁松峰, 邵文豪, 姜景民, 等. 基于种实性状的无患子天然群体表型多样性研究[J]. 生态学报, 2014, **34**(6): 1 451-1 460.

DIAO S F, SHAO W H, JIANG J M, *et al.* Phenotypic diversity in natural populations of *Sapindus mukorossi* based on fruit and seed traits[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, **34**(6): 1 451-1 460.

[17] 段青, 崔光芬. 云南泸定百合遗传多样性的表型与 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(6): 1 106-1 113.

DUAN Q, CUI G F, *et al.* Genetic diversity of *Lilium sargentiae* based on phenotypic traits and ISSR markers[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, **33**(6): 1 106-1 113.

[18] 柳新红, 李因刚, 赵勋, 等. 白花树天然群体表型多样性研究[J]. 林业科学研究, 2011, **24**(6): 694-700.

LIU X H, LI Y G, ZHAO X, *et al.* Phenotypic diversity in natural populations of *Styrax tonkinensis* [J]. *Forest Research*, 2011, **24**(6): 694-700.

[19] HAMRICK J L, GODT M J W, SHERMANBROYLES S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species[J]. *New Forests*, 1992, **6**(1): 95-124.

[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 & Systematics*, 2000, **3**(2): 93-114.

[21] JACQUEMYN H, HONNAY O, GALBUSERA P, *et al.* Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape [J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**(1): 211.

[22] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations[J]. *The Quarterly Review of Biology*, 1979, **8**: 1 191-1 192.

[23] YAO X H, YE Q G, KANG M, *et al.* Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiosyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China[J]. *New Phytologist*, 2007, **176**: 472-480.

[24] 陈娇, 王小蓉, 汤浩茹, 等. 基于 SSR 标记的四川野生中国樱桃遗传多样性和居群遗传结构分析[J]. 园艺学报, 2013, **40**(2): 333-340.

CHEN J, WANG X R, TANG H R, *et al.* Assessment of genetic diversity and populations genetic structure in wild Chinese cherry from Sichuan Province using SSR markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, **40**(2): 333-340.

[25] 赵敏, 戎郁萍. 扁蓿豆 24 个居群遗传多样性的 SSR 研究[J]. 西北植物学报, 2012, **32**(12): 2 405-2 411.

ZHAO M, RONG Y P. Genetic diversity of 24 *Medicago ruthenica* populations using SSR markers[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, **32**(12): 2 405-2 411.

[26] WRIGHT S. Genetical structure of populations[J]. *Nature*, 1951, **15**(4): 323.

[27] SLARKIN M. Gene flow in natural populations[J]. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 1985, **16**(1): 393-430.

[28] LENORMAND T, GUILLEMAUD T, BOURGUET D, *et al.* Evaluating gene flow using selected markers: a case study [J]. *Genetics*, 1998, **149**(3): 1 383-1 392.

[29] 李海生, 陈桂珠. 海南岛红树植物海桑遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生态学报, 2004, **24**(8): 1 656-1 662.

LI H S, CHEN G Z. Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan Island based on ISSR analysis [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, **24**(8): 1 656-1 662.

[30] 杨爱红, 张金菊, 田华, 等. 鹅掌楸贵州烂木山居群的微卫星遗传多样性及空间遗传结构[J]. 生物多样性, 2014, **22**(3): 375-384.

YANG A H, ZHANG J J, TIAN H, *et al.* Microsatellite genetic diversity and fine-scale spatial genetic structure within a natural stand of *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae) in Lanmushan, Duyun City, Guizhou Province[J]. *Biodiversity Science*, 2014, **22**(3): 375-384.

[31] 李楠, 柳新红, 李因刚, 等. 白花树天然群体的遗传多样性[J]. 林业科学, 2012, **48**(11): 49-56.

LI N, LIU X H, LI Y G, *et al.* Genetic diversity in natural populations of *Styrax tonkinensis* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2012, **48**(11): 49-56.

(编辑:宋亚珍)