

基于 ISSR 分子标记的西藏杓兰种群 遗传多样性分析

李 菁¹, 张小飞², 陈珏屹¹, 吴林钦¹, 徐玲玲^{1*}

(1 西安文理学院 生物与环境工程学院, 植物微生物协同研究重点实验室, 西安 710065; 2 西安市农业技术推广中心, 西安 710061)

摘 要: 西藏杓兰(*Cypripedium tibeticum*)是具有很高观赏和药用价值的兰科植物,已被列为中国优先保护的濒危植物。该研究采用 ISSR 分子标记技术,对采自中国西部地区的 7 个西藏杓兰种群进行遗传结构及遗传多样性分析,为中国野生西藏杓兰种质资源的保护提供理论依据。结果显示:(1)从 100 条 ISSR 引物中共筛选出 12 条多态性高、重复性好的引物,共检测出 136 个位点,多态位点百分率(*PPB*)达 100%,总体 Nei's 基因多样性指数(H_e)和 Shannon 信息指数(I)分别为 0.318 6 和 0.484 3,种群间的 Nei's 遗传距离在 0.033 3~0.170 1 之间,Nei's 遗传相似度在 0.843 5~0.967 3 之间,总体遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)分别为 0.222 9 和 1.743 0。(2)基于 UP-GMA 法和邻接法的种群系统聚类结果均显示出四川种群与陕西种群之间存在遗传分化。总体上西藏杓兰种群间遗传分化与地理隔离之间相关性不显著。研究认为,西藏杓兰种群在分子水平上具有丰富的遗传多样性,且四川种群与陕西种群已产生了遗传分化;ISSR 分子标记可用于西藏杓兰种群遗传多样性、遗传结构及种群间遗传分化等方面的研究。

关键词: 西藏杓兰; 遗传多样性; 遗传结构; ISSR

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

Genetic Diversity of *Cypripedium tibeticum* Populations Revealed by ISSR Analysis

LI Jing¹, ZHANG Xiaofei², CHEN Jueyi¹, WU Linqin¹, XU Lingling^{1*}

(1 Key Laboratory of Plant-microbe Collaboration Research, School of Biological and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an 710065, China; 2 Xi'an Agricultural Technology Extension Centre, Xi'an 710061, China)

Abstract: *Cypripedium tibeticum* is a unique orchid species with high ornamental and medicinal value. As one endangered species, it is currently listed as a national protected plant. In this study, genetic structure and genetic diversity of 7 *C. tibeticum* populations collected in western China was analyzed using ISSR molecular markers. This study can provide a reference for species conservation in natural habitats of *C. tibeticum*. The results showed: (1) 12 polymorphic ISSR markers with strong repeatability were chosen from 100 ISSR primers. A total of 136 bands were identified, and the percentage of polymorphic bands (*PPB*) was 100%. Nei's gene diversity (H_e) and Shannon's information index (I) were 0.318 6 and 0.484 3, respectively. The Nei's genetic distance ranged from 0.033 3 to 0.170 1 and genetic similarity ranged from

收稿日期: 2020-02-09; 修改稿收到日期: 2020-05-09

基金项目: 陕西省自然科学基金计划(2019JM-476); 西安市科技计划项目(2020KJWL21)

作者简介: 李 菁(1983—), 女, 博士, 讲师, 主要从事植物分子生态学研究。E-mail: jinglee211@163.com

* 通信作者: 徐玲玲, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事植物与微生物互作研究。E-mail: missilexll@163.com

0.843 5 to 0.967 3 among populations. The overall gene differentiation coefficient (G_{st}) was 0.222 9 and the estimated value of gene flow was 1.743 0. (2) The UPGMA and Neighbor-Joining clustering analysis both indicated clear differentiation between populations from Sichuan and Shaanxi. The overall correlation between genetic distance and geographical distance was not significant. This study indicated high genetic diversity in *C. tibeticum* populations and great divergence between Sichuan and Shaanxi populations on molecular level. ISSR markers could be used for investigating the genetic structure, diversity and genetic differentiation of *C. tibeticum* populations.

Key words: *Cypripedium tibeticum*; genetic diversity; genetic structure; ISSR

兰科(Orchidaceae)作为被子植物的一大科系,广泛分布于多种陆地生态系统,具有极高的物种多样性。兰科植物的繁殖器官性状高度特化,传粉者高度专一化,且常与特定的真菌形成稳定的共生关系,是被子植物中最为进化的类群之一^[1-2]。尽管兰科植物种类丰富,但由于其独特的生境需求和生活史特征,多以小居群或呈狭域式分布,因此较之其他植物类群,更易遭受生境退化与丧失的威胁^[3]。

西藏杓兰(*Cypripedium tibeticum*)系兰科杓兰属多年生草本植物,喜生于海拔 2 300~4 600 m 高山灌丛草甸中或含腐殖质的疏林下,主要分布于中国西南地区,包括西藏、云南、四川等地^[4],在陕西秦岭山区也有零星分布^[5]。同多数杓兰属植物一样,西藏杓兰花形奇特,其唇瓣特化成兜状形似“拖鞋”,具有极高的观赏价值和药用价值。由于人类对杓兰植株的过度采挖,加之森林砍伐、过度放牧等农业活动,西藏杓兰正面临着生境破坏的严重威胁,野生杓兰种群数量急剧下降,甚至已濒临灭绝^[6]。由于目前杓兰属植物的人工栽培和繁育尚存在很大困难,对野生杓兰种质资源的保护已迫在眉睫。包括西藏杓兰在内的多种杓兰属植物已被世界自然保护联盟(IUCN)列入红色预警保护物种(<https://www.iucnredlist.org/>)。

种群是种内的分化单元,由分布在一定空间结构中的同种个体组成,种群的遗传结构及遗传多样性反映出其生存适应和发展进化的内在潜力,也是确定物种管理单元、制定保育策略的重要依据^[7-8]。目前关于杓兰属植物的种群分子遗传学方面已有一些研究报道。蒋明等^[9]对 10 种杓兰属植物的 ITS 序列进行了系统发育分析,将 10 种杓兰分为 3 组;孙叶迎等^[10]通过 ISSR 分析发现长白山区不同花色杓兰属植物具有较丰富的遗传多样性,系统聚类与形态学分类结果基本一致;Qian 等^[11]研究发现中国中东部分布的扇脉杓兰(*C. japonicum*)无论在种群水平还是物种水平上遗传多样性均很低,并且种群间遗传分化程度较高;Pandey 等^[12]利用微卫

星标记研究结果表明分布在北美的肯塔基杓兰(*C. kentuckiense*)种群的遗传多样性及遗传分化程度均较低。Li 等^[13]针对西藏杓兰开发了 20 个具有多态性的微卫星标记位点,并且这些微卫星标记大多数也适用于杓兰属的黄花杓兰(*C. flavum*)和无苞杓兰(*C. bardolphianum*)两个近缘种。Guo 等^[14]应用 2 个叶绿体基因片段 rps16 和 trnL-F 作为分子标记,在中国云南、四川等地分布的 9 个西藏杓兰地理种群中共检测到 7 种单倍型,并发现种群间遗传分化明显,但未呈现出明显的谱系地理分布格局。

ISSR(inter-simple sequence repeat)即简单重复区间序列,是一项基于微卫星标记开发的分子标记技术,综合了 RAPD、AFLP 和 SSR 技术的优点,具有遗传多态性高、遗传信息量丰富、符合孟德尔遗传规律、呈显性遗传标记,且试验重复性好,操作简单,成本低廉等特点,是研究生物近缘种间系统进化及种内遗传变异的理想分子标记,广泛应用于植物种质资源鉴定及种群遗传多样性等领域的研究中^[15]。迄今尚未见 ISSR 标记应用于西藏杓兰种群遗传学方面的研究报道。

本研究利用 ISSR 分子标记技术对采集自中国四川和陕西的 7 个野生西藏杓兰种群的遗传变异进行分析,探讨其遗传多样性水平及遗传结构,以及不同种群间的遗传分化程度与基因流水平,评估该物种的环境适应性及进化潜力,从保护遗传学的角度探讨导致该杓兰面临濒危的内在和外在因素,为保护中国野生西藏杓兰种质资源提出相应的保育措施和保护策略。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试西藏杓兰样本于 2015~2017 年分别采于四川、陕西高海拔山区,徐玲玲博士鉴定。样品采集地信息详见表 1。每个种群采集不少于 10 株植物的叶片组织(采集时仅取少量叶片组织,尽量避免对植株后续生长造成不良影响),采集后立即放入保鲜

表 1 西藏杓兰种群供试样本采集信息

Table 1 Collection information of *Cypripedium tibeticum* populations in this study

种群代码 Population code	采集地点 Location	海拔 Altitude/m	采样数 Sample size	地理坐标 Geo-coordinate	采集时间 Collection date (year-month)
SP	四川松潘县 Songpan County, Sichuan	3 190~3 365	64	32. 75°N, 103. 82°E	2015-06
KD	四川康定 Kangding County, Sichuan	2 891~2 945	23	30. 00°N, 101. 94°E	2016-07
XJ	四川小金县 Xiaojin County, Sichuan	3 494~3 720	26	31. 15°N, 102. 76°E	2017-06
PW	四川平武县 Pingwu County, Sichuan	3 385~3 410	13	32. 58°N, 104. 62°E	2017-06
GZ	四川甘孜县 Ganzi County, Sichuan	3 780~3 826	10	31. 53°N, 99. 74°E	2016-07
TB	陕西太白县 Taibai County, Shannxi	3 066~3 219	15	33. 98°N, 107. 75°E	2017-06
MX	陕西眉县 Meixian County, Shannxi	3 210~3 274	12	34. 02°N, 107. 97°E	2017-06

盒中暂存,随后带回实验室冻存于-80 ℃冰箱备用。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取 以单株西藏杓兰叶片组织样本为单位,应用植物基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen)提取基因组 DNA,以 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,并用 NanoDrop 微量核酸/蛋白检测仪(Thermo)测定 DNA 的浓度及纯度,检测合格后保存于-20 ℃备用。

1.2.2 ISSR 引物筛选及 PCR 扩增 根据加拿大哥伦比亚大学公布的 100 条 ISSR 通用引物序列(引物编号 801~900)进行引物合成(上海生工生物工程有限公)。从 7 个西藏杓兰种群中分别各随机选择一个 DNA 样本对 100 条 ISSR 引物进行筛选,并从 DNA 模板浓度、引物退火温度及 PCR 循环数等参数进行 PCR 反应体系的优化。最终选取 12 条多态性高、稳定性好、扩增条带清晰的 ISSR 引物(表 2)用于供试杓兰种群 ISSR-PCR 扩增反应。

ISSR-PCR 反应体系(20 μL)包含:2×Taq PCR MasterMix 10 μL(Tiagen),ISSR 引物 1 μL(10 mmol/L),DNA 模板 1 μL 及 ddH₂O 8 μL。PCR 扩增程序:95 ℃预变性 3 min;95 ℃ 30 s,49~59 ℃退火 1 min(各 ISSR 引物退火温度详见表 2),72 ℃延伸 1.5 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后,取 8 μL PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测,电泳检测结果在 UVP Biodoc-IT220 凝胶成像系统中观察并拍照记录。

1.3 数据统计与分析

扩增产物在电泳图上的每一条带视作 1 个分子标记,按凝胶中同一位置上的 DNA 条带的有无进行统计,有带的记为 1,无带的记为 0,构建 0/1 二元数据矩阵。在假定供试西藏杓兰种群均处于 Hardy-Weinberg 平衡的前提下,计算各项遗传参数。

应用 Popgene1. 32 软件分别计算多态位点百分率(*PPB*)、观测等位基因数(*N_a*)、有效等位基因数(*N_e*)、Nei’s 遗传多样性指数(*H_e*)、Shannon 信息指数(*I*)、总群体基因多样性(*H_t*)、种群内基因多样性(*H_s*)、种群间遗传分化指数(*G_{st}*)、Nei’s 遗传距离(*D*)。Arlequin35 软件进行 AMOVA 分子方差分析^[16]。应用 MEGA6 软件分别基于 UPGMA(un-weighted pair-group method using arithmetical averages)法和邻接法(Neighbor-Joining)对种群之间进行聚类分析,构建系统聚类树^[17]。根据各采集地经纬度计算出成对种群间的地理距离,并通过 Genepop 在线工具([http://www. genepop. curtin. edu. au/ genepop_ op6. html](http://www.genepop.curtin.edu.au/genepop_op6.html))进行成对种群间的遗传距离与地理距离之间的相关性分析^[18],以检验种群间的遗传分化程度是否与地理隔离显著相关^[19]。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增结果

应用 12 条筛选所得的 ISSR 引物对 7 个种群共 163 株西藏杓兰样本进行 PCR 扩增,经电泳检测与条带统计,共检测到 136 个 DNA 条带,平均每个引物扩增出 11. 3 条,扩增片段大小均在 100 ~ 2 000 bp 之间,其中引物 810、811、834、847 在西藏杓兰部分供试样本中的 ISSR-PCR 扩增电泳图谱如图 1 所示。所检测出的条带均具有多态性,总群体多态性条带比率为 100%(表 2),说明本研究中所选 ISSR 引物在西藏杓兰中均具有很高的多态性,且供试西藏杓兰种群具有丰富的遗传多样性,个体间遗传差异较大。

2.2 西藏杓兰种群遗传多样性分析

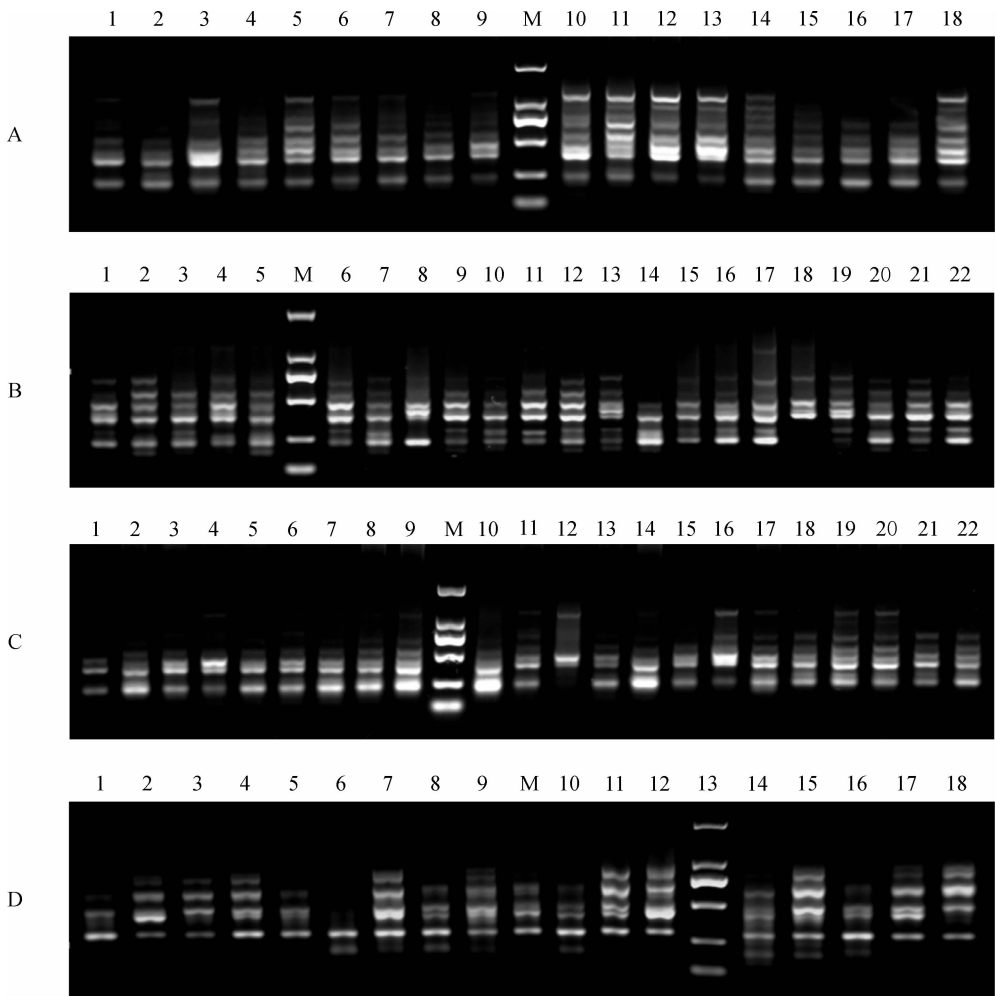
对西藏杓兰 7 个野生种群进行遗传多样性分析,总群体 Nei’s 基因多样性指数(*H_e*)为 0. 318 6,

Shannon 信息指数(I)为 0.484 3。在不同杓兰种群中检测到的多态性位点数及多态性位点百分率均有差异,其中四川松潘种群(SP)这两项参数均为最高,分别为 129 个和 94.85%,而陕西眉县种群(MX)的多态性位点数最少,多态性位点百分率最低,分别为 84 个和 61.76%。7 个种群的观测等位基因数(N_a)在 1.617 6~1.948 5 之间,有效等位基因数(N_e) 在 1.358 6~1.500 7 之间。西藏杓兰 7 个种群的 Nei's 基因多样性大小表现为:松潘种群(SP) > 康定种群(KD) > 平武种群(PW) > 太白种群(TB) > 眉县种群(MX) > 小金种群(XJ) > 甘孜种群(GZ),数值范围在 0.295 8~0.212 5 之间;而 Shannon 信息指数表现为:松潘种群(SP) > 康

定种群(KD) > 平武种群(PW) > 太白种群(TB) > 小金种群(XJ) > 眉县种群(MX) > 甘孜种群(GZ),数值范围在 0.448 2~0.320 4 之间(表 3)。

2.3 西藏杓兰种群遗传分化分析

对西藏杓兰 7 个种群间的遗传相似度及遗传距离进行计算,结果表明 7 个种群的 Nei's 遗传相似度在 0.843 5~0.967 3 之间,Nei's 遗传距离(D) 在 0.033 3~0.170 1 之间,其中四川甘孜种群(GZ)与陕西眉县种群(MX)之间遗传相似度最低,遗传距离最大;而四川小金种群(XJ)与平武种群(PW)之间的遗传相似度最高,遗传距离最小(表 4)。群体遗传分化分析显示,7 个西藏杓兰种群总基因多样性指数(H_t)为 0.309 7±0.023 0,种群内基因多样性



A. 1~18 泳道为四川康定 (KD)种群 1~18 号个体; B、C. 1~22 泳道为四川松潘(SP)种群 1~22 号个体; D. 1~18 泳道为四川小金 (XJ)种群 1~18 号个体; M. DL2000 (条带由小到依次: 100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1 000 bp, 2 000 bp)

图 1 引物 810(A)、811(B)、834(C)、847(D)在部分西藏杓兰实验样本中 ISSR-PCR 扩增结果

A. 1—18. Sichuan Kangding (KD) population sample No. 1—18; B、C. 1—22. Sichuan Songpan (SP) population sample No. 1—22; D. 1—18. Sichuan Xiaojin (XJ) population sample No. 1—18; M. DL2000 (band sizes from small to large are 100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1 000 bp and 2 000 bp)

Fig. 1 ISSR-PCR fingerprints of part *C. tibeticum* samples using primer 810(A), 811(B), 834(C) and 847(D)

表 2 ISSR 引物信息及扩增结果

Table 2 Information of ISSR primers and amplification results

引物序号 Primer code	引物序列 Primer sequence(5'→3')	退火温度 T _m /℃	总条带数 Total number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性条带比例 Percentage of polymorphic bands (PPB)/%
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	53	16	16	100
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	54	14	14	100
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	53	15	15	100
835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	51	15	15	100
836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	51	11	11	100
847	CACACACACACACARC	54	9	9	100
855	ACACACACACACACACYT	55	9	9	100
857	ACACACACACACACACYG	54	13	13	100
876	GATAGATAGACAGACA	49	9	9	100
881	GGGTGGGGTGGGGTG	54	10	10	100
887	DVDTCTCTCTCTCTCTC	59	5	5	100
895	GTTGGTAGCTCTTGATC	55	10	10	100
总计 Total			136	136	100

表 3 西藏杓兰 7 个种群 ISSR 遗传多样性统计

Table 3 The genetic diversity statistics of 7 populations of *C. tibeticum*

种群 Population	观测等位基因数 Observed number of alleles (N _a)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N _e)	Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity (H _e)	Shannon 信息指数 Shannon's information index (I)	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性位点百分率 Percentage of polymorphic loci/%
SP	1.948 5	1.500 7	0.295 8	0.448 2	129	94.85
KD	1.830 9	1.423 6	0.256 6	0.393 1	113	83.09
XJ	1.794 1	1.358 6	0.220 7	0.343 3	108	79.41
PW	1.757 4	1.402 6	0.240 1	0.365 1	103	75.74
GZ	1.632 4	1.360 8	0.212 5	0.320 4	86	63.24
TB	1.713 2	1.402 4	0.233 6	0.351 2	97	71.32
MX	1.617 6	1.395 0	0.225 3	0.333 1	84	61.76
平均值 Average	1.756 3	1.406 2	0.240 7	0.364 9	102.86	75.63
总群体 Total	2.000 0	1.534 3	0.318 6	0.484 3	136	100

指数(H_s)为 $0.240\,7\pm0.014\,8$,总群体的遗传分化系数(G_{st})为 $0.222\,9$,基因流(N_m)为 $1.743\,0$ 。由此可见,西藏杓兰种群间总体遗传分化程度较高($0.15 < G_{st} < 0.25$),种群间基因流较弱。

由表 5 可以看出,西藏杓兰 7 个供试种群之间的方差组分为 $0.613\,3$,所占方差比率为 25.58% ;种群内部的方差组分为 $1.784\,2$,所占方差比率为 74.42% ,且差异均为显著水平($P < 0.001$)。说明西藏杓兰样本间的遗传分化主要来自于种群内部的个体之间,其次来自于种群之间。

2.4 西藏杓兰种群聚类分析

图 2 显示,基于 UPGMA 法构建的系统聚类树中,四川小金种群(XJ)、平武种群(PW)和甘孜种群

(GZ)聚为一个分支,四川松潘(SP)和康定种群(KD)聚为另一个分支;这 5 个四川种群汇集为一大支;另一大支则由陕西太白种群(TB)和眉县种群(MX)两个种群构成(图 2,A)。基于邻接法构建的系统聚类树,表现为四川小金种群(XJ)、甘孜种群(GZ)和平武种群(PW)先聚为一个分支,然后再与四川康定种群(KD)、松潘种群(SP)依次汇合成一个大分支,另一大支则同样由陕西太白种群和眉县种群所组成(图 2,B)。由此可见,虽然基于遗传距离采取不同的聚类方法,所得到的种群间系统聚类树拓扑结构不同,但两种聚类结果均显示四川种群与陕西种群之间已产生了一定水平的遗传分化。此外,除算法不同外,不同聚类方法得到的聚类结构细节的差异

表 4 西藏杓兰 7 个种群间的 Nei's 遗传相似度及遗传距离

Table 4 Nei's genetic identity and genetic distance among 7 populations of *C. tibeticum*

种群 Population	SP	KD	XJ	PW	GZ	TB	MX
SP	—	0.905 2	0.896 6	0.901 1	0.878 3	0.884 3	0.876 7
KD	0.099 6	—	0.919 6	0.906 3	0.874 7	0.877 7	0.859 7
XJ	0.109 1	0.083 8	—	0.967 3	0.951 5	0.890 5	0.859 5
PW	0.104 1	0.098 4	0.033 3	—	0.927 2	0.875 6	0.853 7
GZ	0.129 8	0.133 9	0.049 7	0.075 6	—	0.867 2	0.843 5
TB	0.123 0	0.130 4	0.115 9	0.132 8	0.142 5	—	0.962 1
MX	0.131 6	0.151 2	0.151 4	0.158 1	0.170 1	0.038 7	—

表注:右上角为遗传相似度,左下角为遗传距离
Note: Genetic identity is above the diagonal, while genetic distance is below the diagonal

表 5 西藏杓兰 7 个种群 ISSR 标记的分子方差分析

Table 5 Molecular variance analysis (AMOVA) in 7 populations of *C. tibeticum* based on ISSR markers

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比率 Percentage of variation/%	P 值 P value
种群间 Among populations	6	71.291	0.613 3	25.58	<0.001
种群内 Within populations	158	183.266	1.784 2	74.42	<0.001
总变异 Total	163	245.757	2.397 5	100	
固定系数 Fixation index	$F_{st} = 0.235 6$				

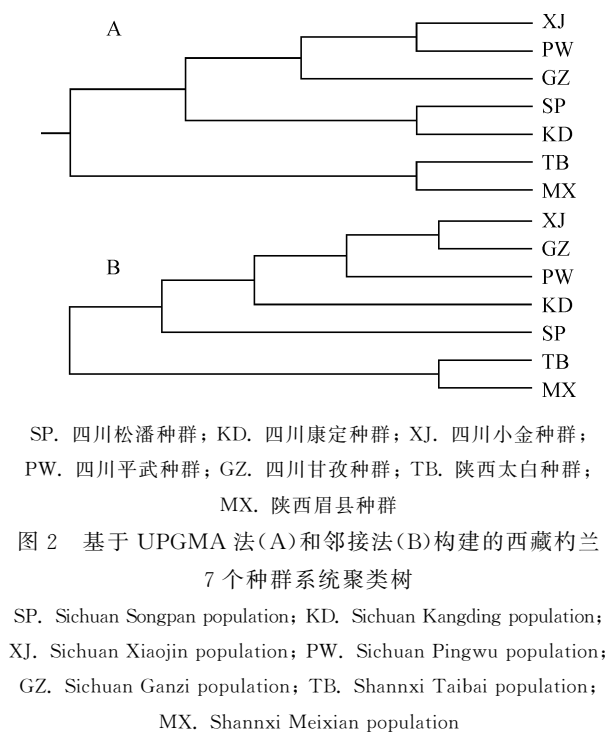


图 2 基于 UPGMA 法(A)和邻接法(B)构建的西藏杓兰 7 个种群系统聚类树

SP. Sichuan Songpan population; KD. Sichuan Kangding population;
XJ. Sichuan Xiaojin population; PW. Sichuan Pingwu population;
GZ. Sichuan Ganzi population; TB. Shannxi Taibai population;
MX. Shannxi Meixian population

Fig. 2 Phylogenetic clustering of 7 populations of *C. tibeticum* based on UPGMA (A) and Neighbor-Joining (B) method

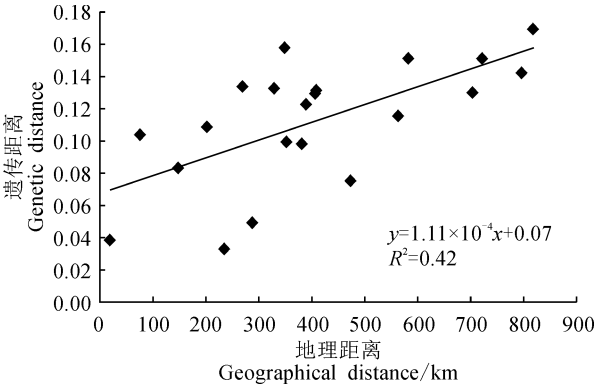


图 3 西藏杓兰 7 个种群遗传距离与地理距离间相关性分析

Fig. 3 Correlation analysis between genetic distance and geographical distance of 7 populations of *C. tibeticum*

可能也与各种群内部遗传多样性的差异有关。

2.5 西藏杓兰种群遗传距离与地理距离间相关性分析

为了检测西藏杓兰种群间的遗传分化程度是否与地理隔离相关,对西藏杓兰成对种群间的遗传距离与地理距离之间的相关性进行 Mantel 检验(图 3),得到遗传距离与地理距离的线性回归方程 $y =$

$1.11 \times 10^{-4}x + 0.07$, 相关系数 R 为 0.6481 ($P = 0.086 > 0.05$, 1 000 次随机抽样), 表明西藏杓兰种群间遗传距离与地理距离之间相关性不显著, 种群间的基因交流在一定程度上受到了地理距离的限制, 但西藏杓兰种群间产生的遗传分化未呈现出明确的地理分布模式。

3 讨 论

植物种群遗传结构和遗传多样性研究, 可以帮助我们了解某种植物在本地区演化历史的基础上对该种植物的野生资源进行保护。本研究应用 ISSR 标记技术, 在分子水平上对分布在中国四川和陕西两省的 7 个野生西藏杓兰种群遗传多样性与遗传结构进行了检测, 并对种群间进行了遗传分化与基因流分析。在西藏杓兰中共筛选得到 12 个 ISSR 多态性位点, 且多态性条带百分率均高达 100%, 说明 ISSR 分子标记技术可作为一种高效的研究手段, 应用于西藏杓兰种群遗传学研究领域。

一个种群的生长环境、分布范围、种群大小和繁殖方式等均会对种群的遗传结构和遗传多样性产生影响, 进而影响该物种的环境适应力和进化潜力。西藏杓兰种群分布地多为高海拔山区, 通常具有较稳定的生态气候, 且分布区海拔梯度的差异给杓兰提供了不同的生长空间, 在自然状态下西藏杓兰常呈现出小种群狭域式分布^[20]。理论上这种分布模式常因种群小而导致遗传漂变, 因空间隔离而导致等位基因在种群内随机固定、种群间产生遗传分化。这种情形已在西藏杓兰一些近缘种属的遗传学研究中陆续得到了证实: 中国中东部的扇脉杓兰 (*C. japonicum*) 种群内遗传多样性低而种群间遗传分化水平高^[11]; 美国北部肯塔基杓兰 (*C. kentuckiense*) 遗传多样性水平低, 遗传分化显著, 且遗传距离与地理隔离显著相关^[12]; 巴西分布的兰科植物 *Oeceoclades maculata* 种群内遗传多样性水平低, 种群间具有显著的遗传分化, 其研究者认为自花授粉、遗传漂变、不同的选择压力、少数个体定殖等均可能是影响遗传多样性和遗传结构的因素^[21]。波兰境内的杓兰 (*C. calceolus*) 遗传多样性及遗传分化程度均属于中等水平, 种群间的遗传距离与地理隔离显著相关, 且种群的遗传多样性水平与种群大小显著相关^[22]。分布于韩国的扇脉杓兰种群内和种群间均未发现存在遗传变异, 说明扇脉杓兰种群在该地区演化史上起源于遗传背景相同的衰落的原始种群^[23]。本研究所得种群的各项遗传参数结果均表

明西藏杓兰种群内均具有较高水平的遗传多样性, 推测分布于中国西部的西藏杓兰在演化历程近期未经历过“瓶颈效应”, 且原始种群的遗传多样性未遭受大面积丧失, 在演化中应对环境变化产生了较丰富的遗传多样性。

遗传结构指种群中遗传变异分布的时空格局, 迁移、突变、选择、遗传漂变、隔离等均是影响种群遗传结构的因素。基因流是种群间遗传结构均质化的主要推动力, 基因流会丰富种群内的遗传多样性, 而使种群间遗传分化的程度减弱。理论上认为, 当 $N_m > 4$ 时, 种群间基因交流相对充分, 基因流能够抵制遗传漂变的作用而使不同种群达到均质化, 阻止种群间遗传分化的产生^[24]。本研究结果表明, 7 个西藏杓兰种群间总体基因流 $N_m = 1.7430 < 4$, 表明西藏杓兰种群间的基因流不足以阻止由遗传漂变引起的种群遗传分化。7 个种群间的遗传距离较大 ($0.0333 \sim 0.1701$), 也与西藏杓兰种群间基因流水平较低有关。“内繁育系数” F 也称为“近交系数”, F 统计量中的 F_{st} 常用来测量亚居群间的遗传分化程度。通常将 F_{st} 值分成 4 个层级区间, 分别与群体间遗传分化程度高低的关系对应为: 当 F_{st} 为 $0 \sim 0.05$ 时, 认为群体间遗传分化很小; F_{st} 为 $0.05 \sim 0.15$ 时, 认为群体间存在中等程度的遗传分化; F_{st} 为 $0.15 \sim 0.25$ 时, 群体间遗传分化较大; 而 $F_{st} > 0.25$ 时, 则认为群体间有很大的遗传分化^[25]。基因分化系数 G_{st} 与 F_{st} 关系密切, 当一个位点只有 2 个等位基因时, 二者相等; 当有多个等位基因时, G_{st} 等于所有等位基因的 F_{st} 的加权平均值。因此对于 ISSR 标记而言, G_{st} 可与 F_{st} 值进行类比并以此判断种群间遗传分化程度。本研究中西藏杓兰种群间存在较大遗传分化 ($G_{st} = 0.2229$), 这与种群间遗传距离较大、群体间基因流较弱的分析结果一致。

西藏杓兰属于自交亲和物种, 但在自然条件下必须依靠传粉媒介才能成功结实。在自然界西藏杓兰的有效传粉昆虫包括 3 种熊蜂蜂王, 即 *Bombus lepidus*, 明亮熊蜂 *B. lucorum* 和 *B. hypnorum*^[26], 由于熊蜂蜂王的活动范围较小, 推测有限的花粉流是造成西藏杓兰种群间产生遗传分化的原因之一。多数兰科植物的种子微小且种皮轻薄, 在自然状态下多数种子仅扩散至母株周围, 只有极少数种子有机会远距离传播并能在其他种群内成功定殖^[27-28], 因此西藏杓兰种子以局部扩散为主可能是其种群间产生较大遗传分化的另一个原因。另外, 本研究发现供试西藏杓兰种群间的遗传分化未呈现出明显的

地理隔离分布模式,推测其原因可能与该杓兰物种多地域起源、历史上发生的种子随机扩散事件以及人类活动有关。

Guo 等^[14]利用 2 个叶绿体 DNA 片段 rps16 和 trnL-F 序列作为分子标记,对分布在中国云南、四川和西藏的 9 个西藏杓兰种群的遗传结构和遗传多样性进行了检测和分析,其结果发现西藏杓兰种群间存在高水平的遗传分化,且种群间遗传距离与地理隔离不具有显著相关性,与本研究结论相符。而其研究结果认为西藏杓兰的种群内部遗传多样性水平低,与本研究结果不一致。本研究采用 ISSR 分子标记,发现供试 7 个西藏杓兰种群内具有丰富的遗传多样性。研究一个物种或种群的遗传结构与遗传多样性,选择不同类型的分子标记往往会造成分析结果的差异^[29]。叶绿体分子标记具有细胞质母系遗传的特点,通常不发生重组^[30],且叶绿体基因组为单倍体,与核基因组相比,单亲遗传的叶绿体基因组的有效群体较小,其遗传变异更容易受到群体遗传效应的影响^[31-32]。对种子植物而言,花粉的分离和种子的散布是决定群体遗传结构的重要因素,在植物开花后授粉并形成种子的过程中,植物的遗传特征极大程度受到了父本的影响。因此,核基因分子标记能更加系统地反映出种群遗传多样性的丰富度。本研究所采用的 ISSR 分子标记呈孟德尔式遗传,大多为显性标记,该标记多态性丰富^[15],因此在研究群体遗传多样性时,该种标记相比于叶绿体分子标记具有更高的灵敏度。

本研究结果表明,供试西藏杓兰种群的遗传多

样性较丰富,而种群间遗传分化程度较高,种群间基因流较弱。推测西藏杓兰在长期进化过程中产生了丰富的遗传多样性,而由于人为大量采挖导致野生种群数量急剧下降的事件发生时间并不久远,使得西藏杓兰遗传多样性在一定程度上暂时仍得以保留。然而由于诸多人为因素,如过度采挖、生长环境被开发为旅游景点等,加剧了野生西藏杓兰生境的碎片化,居群规模日益缩小,对环境潜在的适应力减弱,面临濒危的风险^[33-35],基于本研究结果,在此建议综合采取多种措施来加强对西藏杓兰野生资源的保护:(1)在西藏杓兰的不同分布地区尽可能多的搜集野生杓兰不同种群的种子,连同菌根一起,建立西藏杓兰种子库,以保护现存野生杓兰的遗传多样性;(2)对于种群规模较小、遗传多样性较低的西藏杓兰种群采取就地保护,由于西藏杓兰的自然结实率仅有 9.57%~13.8%^[36],林业管理人员可在花期进行人工授粉,提高授粉和结实率,并加强当地植物保护执法力度,阻止偷采偷挖行为;(3)选择适宜西藏杓兰生存的生境进行人工播种种植,建立新的种群,以增加种群数量;(4)可利用西藏杓兰种子、叶片等进行组织培养技术研究,培养西藏杓兰实生苗用于种群复壮;(5)通过多渠道宣传教育,加强人们对环境及植物资源的保护意识,保护西藏杓兰生存的原生境。今后研究将有待进一步扩大采样区域,加大采样量,并利用多种分子标记相结合的方法,对中国西藏杓兰野生资源的遗传多样性及遗传结构进行更加全面系统的分析和评价,为西藏杓兰植物资源的保护提供理论依据。

参考文献:

[1] FAY M F, CHASE M W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century[J]. *Annals of Botany*, 2009, **104** (3): 359-364.

[2] SWARTS N D, DIXON K W. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens[J]. *Trends in Plant Science*, 2009, **14**(11): 590-598.

[3] FAY M F, PAILLER T, DIXON K W. Orchid conservation: making the links[J]. *Annals of Botany*, 2015, **116** (3): 377-379.

[4] 陈丽飞, 刘树英, 江鹏道, 等. 杓兰属植物研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2012, **51**(9): 1 733-1 735.
CHEN L F, LIU S Y, JIANG P D, *et al.* Research progress on *Cypripedium* Linn. [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2012, **51**(9): 1 733-1 735.

[5] 杨平厚, 徐振武, 冯 宁, 等. 陕西兰科 3 种新记录植物[J]. *西北林学院学报*, 2005, **20**(3): 60-61.
YANG P H, XU Z W, FENG N, *et al.* Three new record species of Orchidaceae in Shaanxi[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2005, **20**(3): 60-61.

[6] ZHENG B Q, ZOU L H, LI K, *et al.* Photosynthetic, morphological, and reproductive variations in *Cypripedium tibeticum* in relation to different light regimes in a subalpine forest [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(7): e0181274. DOI:10.1371/journal.pone.0181274.

[7] BAO W Q, WUYUN T N, LI T Z, *et al.* Genetic diversity and population structure of *Prunus mira* (Koehne) from the Tibet plateau in China and recommended conservation strategies[J]. *PLoS One*, 2017, **12**(11): e0188685. DOI:10.1371/journal.pone.0188685.

[8] CHEN C, LU R S, ZHU S S, *et al.* Population structure and historical demography of *Dipteronia dyeriana* (Sapindaceae), an extremely narrow palaeoendemic plant from China: implications for conservation in a biodiversity hot spot[J]. *Heredity*, 2017, **119**(2): 95-106.

[9] 蒋 明, 李温平, 周 晶, 等. 10 种杓兰属植物 rDNA ITS 序列

- 的克隆与分析[J]. 浙江大学学报(理学版), 2012, **39**(6): 689-695.
- JIANG M, LI W P, ZHOU J, *et al.* Cloning and analysis of rDNA ITS sequences from ten *Cypripedium* plants[J]. *Journal of Zhejiang University* (Science Edition), 2012, **39**(6): 689-695.
- [10] 孙叶迎, 陈丽飞, 刘树英, 等. 长白山区不同花色杓兰属植物遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, **42**(9): 137-143.
- SUN Y Y, CHEN L F, LIU S Y, *et al.* ISSR analysis for genetic diversity of *Cypripedium* in Changbai Mountain area [J]. *Journal of Northwest A&F University* (Nat. Sci. Ed.), 2014, **42**(9): 137-143.
- [11] QIAN X, LI Q J, *et al.* Conservation genetics of an endangered lady's slipper orchid: *Cypripedium japonicum* in China [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, **15**(7): 11 578-11 596.
- [12] PANDEY M, RICHARDS M, SHARMA J. Microsatellite-based genetic diversity patterns in disjunct populations of a rare orchid[J]. *Genetica*, 2015, **143**(6): 693-704.
- [13] LI J, LUO Y B, XU L L. Development of microsatellite markers for *Cypripedium tibeticum* (Orchidaceae) and their applicability to two related species[J]. *Applications in Plant Sciences*, 2017, **5**(12): 1 700 084.
- [14] GUO J L, CAO W J, LI Z M, *et al.* Conservation implications of population genetic structure in a threatened orchid *Cypripedium tibeticum*[J]. *Plant Diversity*, 2019, **41**(1): 13-18.
- [15] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, **24**(5): 613-616.
- WANG J B. ISSR markers and their applications in plant genetics[J]. *Hereditas* (Beijing), 2002, **24**(5): 613-616.
- [16] EXCOFFIER L, LISCHER H E L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, **10**(3): 564-567.
- [17] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2 725-2 729.
- [18] ROUSSET F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance[J]. *Genetics*, 1997, **145**(4): 1 219-1 228.
- [19] DINIZ-FILHO J A F, SOARES T N, LIMA J S, *et al.* Mantel test in population genetics[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2013, **36**(4): 475-485.
- [20] CHUNG M Y, LOPEZ-PUJOL J, MAKI M, *et al.* Genetic diversity in the common terrestrial orchid *Oreorchis patens* and its rare congener *Oreorchis coreana*: inference of species evolutionary history and implications for conservation[J]. *Journal of Heredity*, 2012, **103**(5): 692-702.
- [21] UENO S, RODRIGUES J F, ALVES-PEREIRA A, *et al.* Genetic variability within and among populations of an invasive, exotic orchid[J]. *AoB Plants*, 2015, **7**: plv077.
- [22] BRZOSKO E, WRÓBLEWSKA A, TAŁAŁAJ I, *et al.* Genetic diversity of *Cypripedium calceolus* in Poland[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2011, **295**(1-4): 83-96.
- [23] CHUNG J M, PARK K W, PARK C S, *et al.* Contrasting levels of genetic diversity between the historically rare orchid *Cypripedium japonicum* and the historically common orchid *Cypripedium macranthos* in South Korea [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2009, **160**(2): 119-129.
- [24] WHITLOCK M C, MCCAULEY D E. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4N_m + 1)$ [J]. *Heredity*, 1999, **82**(2): 117-125.
- [25] ROUSSET F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance[J]. *Genetics*, 1997, **145**(4): 1 219-1 228.
- [26] LI P, LUO Y B, BERNHARDT P, *et al.* Deceptive pollination of the lady's slipper *Cypripedium tibeticum* (Orchidaceae)[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2006, **262**(1-2): 53-63.
- [27] MACHON N, BARDIN P, *et al.* Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*[J]. *New Phytologist*, 2003, **157**(3): 677-687.
- [28] JACQUEMYN H, BRYN R, *et al.* A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*[J]. *New Phytologist*, 2007, **176**(2): 448-459.
- [29] WU C A, CAMPBELL D R. Cytoplasmic and nuclear markers reveal contrasting patterns of spatial genetic structure in a natural *Ipomopsis* hybrid zone [J]. *Molecular Ecology*, 2005, **14**(3): 781-792.
- [30] BIRKY C W. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, **92**(25): 11 331-11 338.
- [31] BIRKY C W Jr, MARUYAMA T, FUERST P. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results[J]. *Genetics*, 1983, **103**(3): 513-527.
- [32] PETIT R J, DUMINIL J, FINESCHI S, *et al.* INVITED REVIEW: Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations[J]. *Molecular Ecology*, 2004, **14**(3): 689-701.
- [33] VOLIS S. How to conserve threatened Chinese plant species with extremely small populations? [J]. *Plant Diversity*, 2016, **38**(1): 45-52.
- [34] VOLIS S. Species-targeted plant conservation: time for conceptual integration[J]. *Israel Journal of Plant Sciences*, 2015, **63**(4): 232-249.
- [35] VOLIS S. Securing a future for China's plant biodiversity through an integrated conservation approach[J]. *Plant Diversity*, 2018, **40**(3): 91-105.
- [36] 郝桂灵, 李 鹏, 台永东, 等. 杓兰属植物的开花和结实动态[J]. 生态学报, 2010, **30**(12): 3 182-3 187.
- ZHENG G L, LI P, TAI Y D, *et al.* Flowering and fruit set dynamics in *Cypripedium*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, **30**(12): 3 182-3 187.