



文章编号: 1000-4025(2013)08-1535-09

濒危植物宽叶羌活天然居群 cpDNA 非编码区多态性分析

杨路存¹, 周国英^{1*}, 聂学敏²

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2 青海省生态环境遥感监测中心, 西宁 810000)

摘要: 采用叶绿体 DNA 非编码区直接测序的方法, 对青海、甘肃、四川 3 个省区内濒危植物宽叶羌活 14 个天然居群的遗传多样性和遗传结构进行了研究, 以明确其遗传背景, 为宽叶羌活的保护提供理论依据。结果表明: (1) 14 个居群 138 个个体的序列长度介于 509~515 bp; 碱基组成 A+T 含量较高(平均 67.6%)。 (2) 根据序列的核苷酸变异共鉴定出 31 个单倍型, 其中 9 种单倍型(H5、H1、H9、H10、H16、H17、H19、H20、H22)为居群所共享, 而且单倍型 H5 分布最广、在 10 个群体的 67 个个体中检测到, 占总样品数的 48.56%。 (3) 14 个居群宽叶羌活具有高水平单倍型多样性($Hd=0.7503$)和较高水平核苷酸多样性($Pi=0.00711$), 但 31 个单倍型没有按地理分布形成明显的族群, 各地理单元中的单倍型相互混杂, 没有明显的地理分化模式。 (4) AMOVA 分析、居群间分化度($F_{ST}=0.6024$)分析和基因流($N_m=0.330$)分析的结果一致, 表明宽叶羌活大部分遗传变异(60.24%)发生在居群间, 居群间的基因流较低, 群体间变异是宽叶羌活的主要变异来源。 (5) 14 个居群的遗传距离在 0.000~0.007, 平均为 0.003, 表明居群间的亲缘关系较远, 且居群间的遗传距离与地理距离之间无显著相关关系($P=0.143$), 说明宽叶羌活居群遗传变异的分布没有明显的地理趋势。研究认为, 宽叶羌活居群间高的遗传变异可能是由基因流受阻、遗传漂变、地理隔离造成的, 并提出了对该物种遗传多样性的保护策略。

关键词: 宽叶羌活; cpDNA *trnS-trnG*; 遗传多样性; 遗传结构; 居群

中图分类号: Q346+.5 **文献标志码:** A

Genetic Diversity of the Endangered and Endemic Species, *Notopterygium forbesii*, Based on cpDNA *trnS-trnG* Noncoding Sequences

YANG Lucun¹, ZHOU Guoying^{1*}, NIE Xuemin²

(1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2 Qinghai Ecosystem Remote Sensing Monitoring Center, Xining 810000, China)

Abstract: In order to make clear the genetic background of *Notopterygium forbesii*, and provide theoretical basis for its protection, we assessed the genetic diversity and genetic structure of 138 individuals from 14 natural populations of *N. forbesii*, an endangered and endemic species in Qinghai, Gansu and Sichuan, using cpDNA *trnS-trnG* noncoding sequences. The results showed that: (1) Sequence length varied from 509 bp to 515bp and base composition was with high A+T content of 67.6%; (2) 31 haplotypes were identified based on nucleotide variation. Among them, nine haplotypes(H5, H1, H9, H10, H16, H17, H19, H20, H22) were shared by different populations, and H5 was the most frequent haplotype and represented 48.56% of the total samples; (3) Relatively high level of haplotype diversity($Hd=0.7503$) and nucleotide diversity($Pi=$

收稿日期: 2013-04-03; 修改稿收到日期: 2013-07-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目("973")(2012CB026105); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA0505030304)

作者简介: 杨路存(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事分子生态学方面的研究工作。E-mail: yanglucun2013@gmail.com

* 通信作者: 周国英, 博士, 研究员, 主要从事青藏高原药用植物资源与植被恢复的研究工作。E-mail: zhouguy@nwipb.cas.cn

0.007 11) were detected in 14 populations of *N. forbesii*. However, 31 haplotypes from different populations mixed together and did not form distinct geographically separated clades. (4) Investigations of population differentiation ($F_{ST} = 0.602 4$), gene flow ($N_m = 0.330$) and AMOVA (60.24% genetic variation was partitioned among regions) all demonstrated that high genetic differentiation existed among population. (5) The genetic distance of 14 populations of *N. forbesii* ranged from 0.000~0.007, with an average of 0.003, indicating that the genetic relationship between populations of *N. forbesii* was relative far. And there was no significant correlation between genetic distance and geographic distance, illustrating that there was no obvious geographical trends of the distribution of the population genetic variation in *N. forbesii*. Many factors might attribute to the high level of genetic differentiation, such as; limited gene flow; genetic drift; geographical isolation. Based on our results, we proposed some conservation strategies.

Key words: *Notopterygium forbesii*; cpDNA *trnS-trnG*; genetic diversity; genetic structure; population

宽叶羌活 (*Notopterygium forbesii* de Bois-sieu) 是中国特有的羌活属的多年生草本植物^[1-2], 与同属的羌活 (*N. incisum* Ting ex H. T. Chang) 同为药材羌活的基源植物, 以根茎及根入药^[3], 主要分布在四川、青海、甘肃、西藏等省的高寒山区^[4-5]。宽叶羌活是中、藏、羌医药体系中常用药材, 主要含挥发油和香豆素类成分。具有散寒、祛风、除湿、止痛功效, 主治风寒感冒头痛、风湿痹痛等症^[6], 现代药理研究表明对心脑血管疾病也有确切疗效。目前, 用宽叶羌活的中(藏)成药有 200 余种, 用药需求量非常大。近年来的掠夺性采挖和生境破坏, 致使各个道地产区资源受到严重威胁, 已被列入国家Ⅲ级保护植物, 并进入中国濒危物种红色名录^[7]。

物种的遗传多样性是其长期进化的产物, 是维持其繁殖活力和适应环境变化的基础, 同时也是其他多样性的基础和最重要的部分, 而群体的遗传多样性水平在相当程度上制约着一个群体对环境的适应能力, 因而可预测该群体的发展趋势^[8]。近年来的研究表明, 遗传多样性的丧失将对物种生存带来不利影响^[9]。对濒危植物遗传多样性研究不仅能了解物种的进化历史以及导致物种稀有或濒危的机制, 而且关系到能否采取科学有效的措施来保护濒危物种, 是保护生物学研究的核心之一^[10]。为了有效保护宽叶羌活的遗传多样性, 深刻揭示其濒危机制和制定科学的保育策略, 迫切需要研究其遗传变异情况和居群遗传结构。但目前国内对宽叶羌活的研究局限于其种子萌发^[11]、系统分类^[12]、化学成分分析^[13]、人工育苗技术^[14]、群落与环境的关系^[15]等多方面的研究, 对宽叶羌活的遗传多样性和遗传分化研究还比较少。

由于叶绿体 DNA (cpDNA) *trnS-trnG* 间隔区的 DNA 是其遗传物质 DNA 的一部分, 在植物中具有稳定性, 不随季节的改变而发生变化的特点, 因此

cpDNA 非编码区核苷酸序列变异经常被使用来分析植物的居群遗传变异和系统地理学问题。另外, 技术上选择 DNA 测序的方法还可以避免在利用限制片段长度多态性 (RFLP) 和基于 PCR 的指纹图谱法时经常遇到的长度同塑性 (length homoplasy) 问题, 从而提高估算居群遗传结构和基因流的分辨率^[16]。本研究利用 cpDNA 为分子标记, 对宽叶羌活居群的遗传多样性和遗传结构进行分析, 旨在了解其遗传背景, 为宽叶羌活的保护提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源

采样工作于 2008~2009 年 8 月进行, 在青海、甘肃、四川 3 个省区内选取具有代表性的 14 个居群 (图 1、表 1), 每个居群选取成年植株 8~12 株, 根据随机取样原则, 取样的宽叶羌活株距在 30 m 以上。野外采集新鲜、完整的植物幼嫩叶片, 置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存。凭证标本存放于中国科学院西北高原生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 依据改良的 CTAB 法从硅胶干燥的叶片中提取总 DNA。通过测定紫外光吸收值来确定 DNA 浓度和纯度, 利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。

1.2.2 PCR 扩增与 DNA 测序 对 cpDNA 的 *trnS-trnG* 区段进行 PCR 扩增, 使用通用引物 *trnS* (5'-GCCGCTTTAGTCCACTCAGC-3') 和 *trnG* (5'-GAACGAATCACACTTTTACCAC-3'); 扩增反应在 Biometra thermal cycler PCR 扩增仪上进行, 反应体系为 25 μ L, 内含 10 \times 缓冲液 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 总模板 DNA 1 μ L (10~20 ng), 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 正反引物各 1 μ L (10 pmol), *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L (5 U), 以及

ddH₂O 17.3 μL。扩增反应程序为:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 1 min,52 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环,最后 72 °C 保温 7 min。

扩增反应结束后在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物产量和纯度。电泳条带单一整齐,且亮度较高时,扩增产物即可以使用试剂盒进行纯化。选用离心柱型 DNA 产物纯化试剂盒 (Tiangen, Beijing, China) 进行纯化。纯化后的 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用微量核酸蛋白检测仪 ND-1000 (NANODROP, America) 进行定量,之后即可进行测序反应。

测序反应在 ABI3730XLDNA 测序仪上进行,使用 ABI 公司提供的 Bigdye Terminator (Applied Biosystems, America) 试剂。测序反应总体系为 10 μL:2.5 μL Bigdye Terminator;引物 5 pmol;模板 25~50 ng,测序反应的条件如下:95 °C 8 s,95 °C 15 s,50 °C 15 s,60 °C 90 s,25 个循环,60 °C 90 s,4 °C 5 min。

表 1 宽叶羌活 14 个居群的地理来源、样本数、叶绿体单倍型以及每个居群的单倍型多样性和核苷酸多样性

Table 1 Geographic origins, sample sizes, cpDNA haplotypes, as well as estimates of gene diversity (H_d) and nucleotide diversity averaged across loci (P_i) of the 14 *N. forbesii* populations

居群编号 Code	居群 Population	凭证标本 Voucher	地理坐标 Geographical coordinate	海拔 Alt. /m	样本数 Number	单倍型多样性 H_d	核苷酸多样性 P_i
HY	青海湟源 Huangyuan, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou001	101.36°E 36.73°N	3 032	8	0.892 9	0.004 046
HZH	青海湟中 Huangzhong, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou002	101.69°E 36.30°N	2 912	10	0.977 8	0.006 021
PA	青海平安 Ping'an, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou003	101.90°E 36.31°N	2 945	12	0.833 3	0.004 794
LD	青海乐都 Ledu, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou004	102.40°E 36.69°N	2 704	8	0.964 3	0.005 790
MH	青海民和 Minhe, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou005	102.64°E 36.17°N	2 405	9	0.583 3	0.001 631
HZ	青海互助 Huzhu, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou006	102.43°E 36.87°N	2 800	8	0.00 0	0.000 00
MY1	青海门源仙米 Menyuan, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou009	101.40°E 37.45°N	2 945	12	0.000	0.000 00
MY2	青海门源青石嘴 Menyuan, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou010	102.00°E 37.28°N	2 770	11	0.781 8	0.003 693
ZK	青海泽库 Zeku, Qinghai	周国英 G. Y. Zhou014	101.94°E 35.31°N	2 907	10	0.955 6	0.007 494
TZ1	甘肃天祝炭山岭 Tianzhu, Gansu	周国英 G. Y. Zhou007	102.66°E 36.97°N	2 923	10	0.466 7	0.004 531
TZ2	甘肃天祝朱岔岭 Tianzhu, Gansu	周国英 G. Y. Zhou008	102.61°E 36.93°N	2 693	9	0.222 2	0.003 038
XH	甘肃夏河 Xiahe, Gansu	周国英 G. Y. Zhou011	102.90°E 35.37°N	2 234	10	0.200 0	0.000 392
HZU	甘肃合作 Hezuo, Gansu	周国英 G. Y. Zhou012	102.91°E 35.06°N	2 919	10	0.000	0.000 00
REG	四川若尔盖 Ruogai, Sichuan	周国英 G. Y. Zhou013	103.18°E 33.60°N	3 254	11	0.181 8	0.000 710
	合计 Total				138	0.750 3	0.007 111

注:(1)凭证标本存放在中国科学院西北高原生物研究所植物标本馆(HNWP)。

Note:(1) All the vouchers are preserved in the herbarium of Northwest Institute of Plateau Biology, the Chinese Academy of Sciences(HNWP).

1.3 数据分析

用 Clustal X 软件作序列对位排列,并加以手工适当校正。在所有序列校对正确后,用 DnaSP4.0

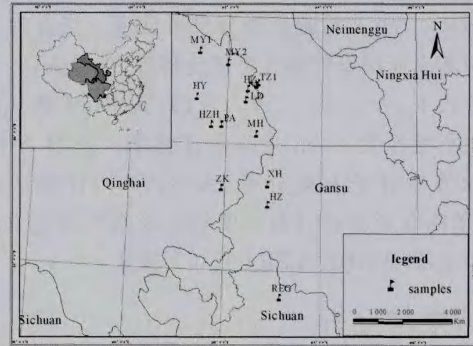


图 1 宽叶羌活采样居群的地理分布图

居群的编号(HY 等)与表 1 编号一致

Fig. 1 The geographical distribution of the 14 populations of *N. forbesii*

All of the population codes are accordant with Table 1

程序统计 cpDNA 单倍型,计算各居群核苷酸多样性、单倍型多样性、计算居群间基因流值(N_m)。使用 MEGA 软件包计算单倍型间 Kumra 双参数遗传距离,并作邻接法(Neighbor-joining Method)分析。通过 Bootstrap 法检验重建分支可信度。居群内和居群间基因流用每代雌性个体迁移数(N_m)估计,该值由公式 $F_{ST} = 1/(1 + 2N_m)$ 求出,其中, N 是有效居群大小雌性数目, m 是雌性迁移率。选用 Arlequin 软件作分子方差分析(AMOVA),计算居群内、居群间变异方差分布。单倍型之间网络关系通过软件 NETWORK VER4.2.0.1 构建。

2 结果与分析

2.1 序列变异

对宽叶羌活 14 个自然居群 138 个个体的 cp

DNA *trnS-trnG* 基因间片段进行了测序和比对。序列长度在 509~515 bp 之间,排序后长 518 bp。合并相同的序列共得到 31 个单倍型(H1~H31),单倍型序列注册于 GenBank 数据库中(HQ269393-HQ269414)。通过统计这一片段所有个体的序列发现,碱基 A 与 T 在整个序列中所占比例为 67.6%,这与大多数叶绿体 DNA 基因间区碱基组成成分相符^[16-17]。

31 种单倍型对位排列后得到的 518 bp 中共有 22 处变异位点,其中简约信息位点 9 处。表 2 显示,在 22 处变异位点中,13 处是由碱基置换造成的,9 处为插入/缺失所致,其中 13 处由碱基置换所造成的变异位点中,7 处为碱基转换(6 处 A↔G 转换,1 处 C↔T 转换),6 处为碱基颠换(3 处 A↔T 颠换,1 处 A↔C 颠换,2 处 G↔T 颠换)。

表 2 宽叶羌活 cpDNA *trnS-trnG* 片段 31 种单倍型进行序列比对的变异位点

Table 2 Variable sites of the aligned sequences among 31 haplotypes of the *trnS-trnG* fragment of *N. forbesii*

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable site																					
	199	200	201	202	203	277	278	279	311	325	335	342	411	414	423	430	473	478	482	493	503	510
H23	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	G	A	-	A	T	G	T	G	A	A	G	A
H24	-	-	-	-	-	T
H25	-	-	-	-	-	C	A	.	-	.	C	A	.	.	T	.	A	.
H26	-	-	-	-	-	A	.	-	.	C	.	.	T	.	.	A	.
H27	-	-	-	-	-	C	A	.	-
H28	-	-	-	-	-	A	.	-	T	.	.	.
H2	-	-	-	-	-	.	.	-	-	T	T	.	.	G
H1	-	-	-	-	-	-	T	.	.	G
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	G	.	.	G	T	T	T	.	.	G
H7	C	C	T	G	G	-	-	-	G	.	.	G	T	T	T	.	.	G
H8	-	-	-	-	-	-	-	-	G	.	.	G	-	T	T	.	.	G
H11	-	-	-	-	-	.	-	G	G	.	.	G	-	T	T	.	.	G
H6	-	-	-	-	-	.	-	G	G	.	.	G	T	T	T	.	.	G
H12	-	-	-	-	-	.	.	G	G	.	.	G	-	T	T	.	.	G
H10	-	-	-	-	-	.	-	.	G	.	.	G	-	T	T	.	.	G
H9	-	-	-	-	-	.	.	.	G	.	.	G	-	T	T	.	.	G
H13	-	-	-	-	-	.	.	.	G	.	.	G	T	T	.	.	G
H14	-	-	-	-	-	.	.	-	G	.	.	G	-	T	.	.	G
H4	-	-	-	-	-	G	-	T	.	.	G
H16	-	-	-	-	-	G	-	T	T	.	.	G
H15	-	-	-	-	-	G	T	T	T	.	.	G
H17	-	-	-	-	-	.	.	-	.	.	.	G	-	T	T	.	.	G
H20	-	-	-	-	-	-	T	T	.	.	G
H19	-	-	-	-	-	.	.	-	-	T	T	.	.	G
H18	-	-	-	-	-	T	T	T	.	.	G
H21	-	-	-	-	-	C	.	.	-	T	T	.	.	G
H29	-	-	-	-	-	.	.	-	.	.	A	.	-	T	T	.	.	.
H22	-	-	-	-	-	A	.	-	T	T	.	.	G
H30	-	-	-	-	-	-	T	T	.	.	.
H31	-	-	-	-	-	.	.	-	-	T	T	.	.	.
H3	-	-	-	-	-	.	.	.	G	.	.	.	-	.	.	.	G	.	.	T	.	G

2.2 单倍型的地理分布

31 种单倍型组成和分布(表 3、图 2)表明,有 22 种单倍型专一存在于各自相应的居群中,其他 9 种单倍型为居群所共享(H5、H1、H9、H10、H16、H17、H19、H20、H22),其中单倍型 H5 是分布最广、频率最高的单倍型,它在 10 个群体 67 个个体中检测到,占总样品数的 48.56%。同时一些共享的单倍型分布于相距很远的居群中,如门源居群和若尔盖居群共享单倍型 H5,泽库居群和湟源居群共享单倍型 H22。

从图 2 可知,31 个单倍型并没有按地理分布形成明显的族群,各地理单元中的单倍型相互混杂,没

有明显的地理分化模式。

2.3 遗传多样性

宽叶羌活 cpDNA *trnS-trnG* 非编码区序列的单倍型多样性(Hd)与核苷酸多样性(Pi)见表 1。从物种水平上看,31 个单倍型的单倍型多样性为 $Hd=0.7503$,核苷酸多样性 $Pi=0.00711$ (表 1),表明宽叶羌活具有较高的遗传多样性。从各个居群来看,青海泽库居群的遗传多样性最高($Hd=0.9556$; $Pi=0.007494$),而甘肃夏河(XH)和四川若尔盖(REG)居群的遗传多样性最低($Hd=0.2000$, $Pi=0.000392$; $Hd=0.1818$, $Pi=0.000710$)(表 1)。

表 3 宽叶羌活单倍型的地理分布

Table 3 Geographical distribution of haplotypes in populations of *N. forbesii*

单倍型 Haplotype	居群 Population														个体数 No. of individuals
	HY	HZH	PA	LD	MH	HZ	MY1	MY2	ZK	TZ1	TZ2	XH	HZU	REG	
H1		1	2												3
H2											1				1
H3		1													1
H4		1													1
H5		1				8	12	1	1	7	8	9	10	10	67
H6														1	1
H7										3					3
H8												1			1
H9		1	1	1											3
H10				1	6			2							9
H11	1														1
H12	1														1
H13		2													2
H14					1										1
H15		1													1
H16	1	1	1	1											4
H17				1	1			2							4
H18		1													1
H19	1				1			5							7
H20	3		5	2					2						12
H21									1						1
H22	1		1						1						3
H23									1						1
H24		1													1
H25									1						1
H26			1												1
H27				1											1
H28									1						1
H29								1							1
H30									2						2
H31				1											1
总计 Total	8	10	12	8	9	8	12	11	10	10	9	10	10	11	138

2.4 群体遗传结构

根据宽叶羌活 cpDNA *trnS-trnG* 非编码区序

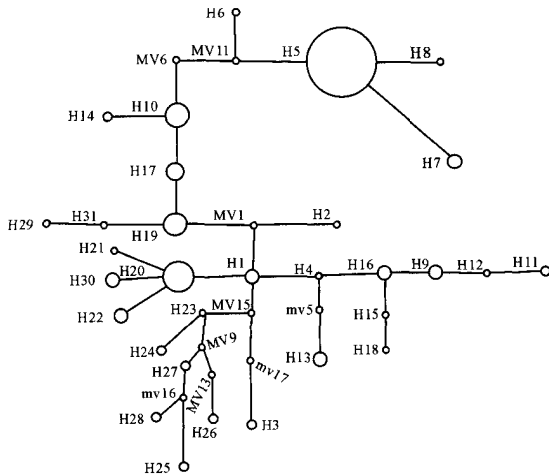


图2 cpDNA *trnS-trnG* 片段的单倍型谱系图

H1~H31 为单倍型;圆的大小与单倍型的频率一致

Fig. 2 Haplotype network of the cpDNA *trnS-trnG* fragment

H1~H31 are the haplotypes; The size of circle is proportional to the relative frequency of the haplotypes in this study

列变异估算出的居群间分化度 F_{ST} 值(0.6024)和基因流(0.330)。基于 cpDNA *trnS-trnG* 非编码区序列变异的 AMOVA 分析表明,宽叶羌活大部分(60.24%)遗传变异发生在居群间,只有 39.76% 的遗传变异发生在居群内(表 4),居群间的遗传分化大于居群内的分化,说明群体间变异是宽叶羌活的主要变异来源。居群间的基因流($N_m=0.330$),表明连宽叶羌活各居群间的基因流较低。

2.5 群体间的系统发育关系

遗传距离是衡量居群间遗传分化程度的最重要指标,本研究中宽叶羌活各居群间遗传距离见表 5。从表 5 中可以看出,各居群的遗传距离在 0.000~0.007,平均为 0.003。ZK 与 HZ、MY1、TZ1、TZ2、XH、HZU、REG 遗传距离最远($D=0.007$),表明它们之间的亲缘关系较远。

利用 Mantel 统计分析,对居群间的遗传距离和地理距离之间进行了 Mantel 检测,并进行 1000 次随机检测,其 $r=0.049$,显示两者之间不相关($P=0.143$),表明宽叶羌活居群遗传变异的分布没有明显的地理趋势。

表 4 宽叶羌活叶绿体单倍型 AMOVA 分析结果

Table 4 Analysis of molecular variance(AMOVA) for populations of *N. forbesii* based on cpDNA *trnS-trnG* sequences

遗传变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	方差 Stdev square	遗传变异组分 Variance component	遗传变异的比例 Variation/%	固定指数 Fixation index
合计 Total population	137	252.333	1.918 00		
居群间 Among populations	13	157.78	1.155 47	60.24	$F_{ST}=0.602 44$
居群内 Within population	124	74.55	0.762 53	39.76	

表 5 14 个宽叶羌活居群的地理距离(km)(对角线上方)和遗传距离(D)(对角线下方)

Table 5 Geographic distance(km)(above diagona 1) and genetic distance(D)(below diagona 1) between the 14 natural populations of *N. forbesii*

	HY	HZH	PA	LD	MH	HZ	MY1	MY2	ZK	TZ1	TZ2	XH	HZU	REG
HY	0.000	56.18	67.15	92.81	130.32	96.53	80.14	83.49	166.29	118.71	113.45	205.02	232.23	385.337
HZH	0.005	0.000	18.85	76.87	86.42	91.56	130.45	112.41	112.37	114.19	107.93	150.30	176.5	329.49
PA	0.004	0.005	0.000	61.50	68.17	78.21	134.34	108.23	111.25	99.92	93.64	138.02	166.25	323.12
LD	0.003	0.004	0.004	0.000	61.68	20.19	122.53	74.61	158.93	38.79	32.59	153.51	186.98	350.83
MH	0.003	0.003	0.005	0.004	0.000	80.01	180.12	135.97	114.61	88.97	84.55	91.99	125.82	289.98
HZ	0.003	0.003	0.005	0.004	0.001	0.000	111.76	59.44	178.96	23.27	17.34	172.05	205.85	369.93
MY1	0.003	0.003	0.005	0.004	0.001	0.000	0.000	56.29	242.82	123.69	121.78	267.41	298.25	457.38
MY2	0.002	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	219.12	67.91	66.64	227.17	260.01	422.92
ZK	0.005	0.006	0.005	0.005	0.006	0.007	0.007	0.005	0.000	195.58	189.92	87.33	92.43	221.53
TZ1	0.003	0.003	0.005	0.004	0.001	0.000	0.000	0.003	0.007	0.000	6.29	179.21	213.57	377.69
TZ2	0.003	0.003	0.005	0.004	0.002	0.001	0.001	0.003	0.007	0.001	0.000	175.41	209.68	373.83
XH	0.003	0.003	0.005	0.004	0.001	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.001	0.000	34.48	198.48
HZU	0.003	0.003	0.005	0.004	0.001	0.000	0.000	0.003	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	164.23
REG	0.003	0.003	0.005	0.004	0.001	0.000	0.000	0.003	0.007	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000

3 讨 论

3.1 宽叶羌活的遗传多样性

普遍认为稀有的或分布区狭窄的物种遗传多样性水平偏低^[18-19],但近年来也有研究报道显示^[20-21]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。本实验通过对濒危植物宽叶羌活 14 个自然居群的 cpDNA *trnS-trnG* 分析得到其物种水平的 H_d 、 P_i 的值分别为 0.750 3、0.007 111,表明宽叶羌活物种水平上的遗传多样性较高。这种高的遗传多样性在同属的羌活(*Notopterygium incisum*)中也被检测到^[22]。以往有研究显示,导致狭域、濒危物种具有高水平遗传多样性的因素有新种形成、繁育系统、形态突变、多次奠基者效应或者冰期残余种等^[23-24]。宽叶羌活物种水平上较高的遗传多样性可能与以下因素有关。第一,可能与宽叶羌活的繁育系统有关。虽然宽叶羌活繁育系统的研究尚未见报道,但与宽叶羌活同属的羌活为异交类型,异交方式可以为植物提供较高的遗传多样性^[25],杂合的子代个体通过营养繁殖将杂合基因位点固定下来从而维持其遗传多样性。第二,可能与该物种具有的独特进化历史有关。其祖先可能具有较广泛的遗传分布,受第四纪冰川的影响,造成了大量个体的灭绝,仅有限个体在一些“避难所”中得以生存下来,在长期进化过程中幸存个体保留了其祖先总体丰富的遗传基础(如单倍型 H5 广泛分布于距离较远的 10 个群体中),使得其现存物种具有较高水平的遗传多样性。

3.2 宽叶羌活的遗传结构

一个物种或群体的进化潜力,在很大程度上取决于它的居群遗传结构^[25]。确定一个物种的居群遗传结构,是了解其生物学属性,探讨物种进化过程和机制的重要一步。居群遗传结构,就是遗传变异在空间的分布式样,一般由 AMOVA 软件来分析。基因分化系数(F_{ST})是衡量居群遗传分化最常用的指标,它表示在总的遗传变异中居群间变异所占的比例。一般情况下,对于濒危物种来说,居群间的遗传变异相对较大,分化明显,如中国疵粒野生稻^[26]、银杉^[27]。植物的居群遗传结构受多种因素的影响,Hamrick 等^[25]的研究表明,植物的繁育系统、基因流和种子扩散机制及自然选择等因素对植物的遗传结构有明显的影响。同时,遗传结构还与物种的进化历史和生物学特性有关^[28]。此外,环境异质性对遗传结构也有一定的影响^[29]。本研究中,AMOVA

数据表明宽叶羌活的遗传变异主要分布在居群间(60.24%),居群内变异较小(39.76%), F_{ST} 也显示了相似的结果。这个种高的遗传分化可能与以下因素有关。

(1)基因流受阻。因环境破坏和地理隔离导致的基因流小是造成其居群间遗传分化大的另一个主要的原因。一般物种的遗传结构是通过居群内和居群间的遗传分化来体现的,但基因流的大小也可以反映居群遗传分化的大小。基因流大的物种,居群间的遗传分化小,因为大的基因流可以防止居群间的遗传分化,防止近交衰退^[30];反之,居群间的遗传分化大^[31]。对于宽叶羌活而言,一方面,近年来的人为过度采挖,加上人类活动对自然生境的破坏,导致宽叶羌活居群分布范围缩小,部分居群仅有少数个体存在(如 HY 居群和 HZ 居群),居群的缩小和个体数量减少导致生境的破碎化,阻断了居群间的基因交流,进一步加剧了居群的遗传分化^[31-32]。另一方面,青藏高原独特的地形和气候。在青藏高原内部千山万壑、峡谷纵横,而宽叶羌活主要分布于青藏高原的高山沟谷和林缘下,青藏高原独特而复杂的地形通过阻断种子或花粉的传播来阻止居群间的交流,居群间有限的基因流($N_m = 0.330$)进一步证明了这一点。因此,青藏高原地区的地理格局可能导致了宽叶羌活居群的隔离,加大了居群间的遗传分化。对 *Megacodon stylophorus*^[33]、大花红景天(*Rhodiola crenulata*)^[34]、唐古特山萼若(*Anisodus tanguticus*)、独一味(*Lamiophlomis rotata*)^[35]、唐古特大黄(*Rheum tanguticum*)等青藏高原植物居群的遗传多样性及遗传分化研究也表明,分布地区内复杂的地理条件,往往是导致居群隔离,促进居群间遗传分化的原因。

(2)遗传漂变。遗传漂变以及遗传隔离都可能导致居群间产生较大的遗传变异^[36]。Fischer 等^[37]认为遗传距离与地理距离之间缺乏显著相关性意味着遗传漂变在居群间的分化中起着不可忽视的作用;或者当一个居群与其他居群相互隔离时,遗传漂变成为影响居群遗传结构和增加居群间遗传变异的重要因素。在本研究中,宽叶羌活居群间的遗传距离与地理距离之间没有显著的相关性($P > 0.05$),单倍型的地理分布结果也显示宽叶羌活自然居群没有表现出明显的地理区域倾向。因此,遗传漂变也是导致宽叶羌活居群间变异较大的又一个重要原因。

3.3 宽叶羌活的保护

物种的遗传多样性及其居群的遗传结构分析,可以为珍稀濒危物种保护价值的评估以及保护策略的制定提供非常重要的信息^[38]。针对宽叶羌活物种水平上具较高的遗传多样性,且主要存在于居群间,居群分化明显,我们提出以下几点保护策略:第

一,保护好其赖以生存的生境。第二,保护尽可能多的居群和个体。第三,可以在9月中下旬,人工采集部分成熟种子撒播到其他居群中,以便加强居群间的基因流动。第四,在迁地保护采样过程中,在各个居群内可以少取样,但要在尽可能多的居群中取样,以便提高栽培居群的遗传多样性。

参考文献:

- [1] PU F T(溥发鼎), WANG P L(王萍莉), ZHENG ZH H(郑中华), *et al.* A reclassification of *Notopterygium boissieu* (Umbelliferae)[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), 2000, **38**(5): 430(in Chinese).
- [2] WANG Y P(王幼平), PU F T(溥发鼎), WANG P L(王萍莉), *et al.* Studies on the systematics of the Chinese endemic genus *Notopterygium*[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 1996, **18**(4): 424(in Chinese).
- [3] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 170-171.
- [4] WU ZH Y(吴征镒). Discussion the partition problem of China flora[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 1979, **1**(1): 1-22(in Chinese).
- [5] ZHOU Y(周毅), JIANG SH Y(蒋舜媛), MA X J(马小军), *et al.* Resource crisis and protective measures on Rhizoma et Radix *Notopterygii*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2003, **34**(10): 12(in Chinese).
- [6] XU H B(徐惠波), SUN X B(孙晓波). Studies on the pharmacological activity of volatile oil in *Notopterygium incisum*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 1991, **22**(1): 28-30(in Chinese).
- [7] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录(第1卷)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 8 507.
- [8] SCACCHI R, ANGELIS G D, CORBO R M. Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae)[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 1991, **176**(1/2): 53-61.
- [9] LI J H(李建辉), JIN Z X(金则新), LI J M(李钧敏). Genetic diversity of endangered plant *Torreyajackii*: A study with RAPD markers[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2007, **18**(12): 2 661-2 667(in Chinese).
- [10] ZHANG D Y(张大勇), JIANG X H(姜新华). Progress in studies of genetic diversity and conservation biology of endangered plant species[J]. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), 1999, **7**(1): 31-37(in Chinese).
- [11] ZHANG N H(张恩和), CHEN X L(陈小莉), FANG Z S(方子森), *et al.* Studies on seed dormancy mechanism and breaking technique of wild *Notopterygium incisum*[J]. *Acta Agrestia Sinica* (草地学报), 2007, **15**(6): 1-5(in Chinese).
- [12] PU F T(溥发鼎), WANG P L(王萍莉), ZHENG ZH H(郑中华), *et al.* A reclassification of *Notopterygium boissieu* (Umbelliferae)[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), 2000, **38**(5): 430-436(in Chinese).
- [13] WANG SH(王曙), WANG T ZH(王天志). Studies on the chemical constituents of *Notopterygium forbesii* Boiss[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 1996, **21**(5): 294-296(in Chinese).
- [14] DONG SH J(董生健). Domestication cultivation techniques of wild *Notopterygium*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2010, **1**(1): 38-39(in Chinese).
- [15] JIANG SH Y(蒋舜媛), SUN H(孙辉), HUANG X J(黄雪菊), *et al.* Environmental pedology of *Notopterygium incisum* and *N. forbesii*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2005, **36**(6): 917(in Chinese).
- [16] CHIANG T Y, CHIANG Y C, CHEN Y J, *et al.* Phylogeography of *kandelia candel* in east asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs[J]. *Molecular Ecology*, 2001, **10**(11): 2 697-2 710(in Chinese).
- [17] LU S Y, HONG K H, LIU S L, *et al.* Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cp-DNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization[J]. *Journal of Plant Research*, 2002, **115**(1 119): 203-216.
- [18] HICKEY R J, VINCENT M A, GUTTMAN S I. Genetic variation in running buffalo clover (*Trifolium stofoniferum*, Fabaceae)[J]. *Conservation Biology*, 1991, **5**(3): 309-316.
- [19] LI A(李昂), GE S(葛颂). Advances in plant conservation genetics[J]. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), 2002, **10**(1): 61-71(in Chinese).

- [20] RICHTER T S, SOLTIS P S, SOLTIS D E. Genetic variation within and among populations of the narrow endemic, *Delphinium viridescens* (Ranunculaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 1994, **81**(8): 1 070—1 076.
- [21] SONG W H(宋卫华), LI X D(李晓东), LI X W(李新伟), et al. Genetic diversity and conservation strategy of *Psilopogon umsinense*, a rare species in the Three Gorges Reservoir area[J]. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), 2004, **12**(2): 227—236 (in Chinese).
- [22] TANG X F(唐学芳), JIANG SH Y(蒋舜媛), SUN H(孙 辉), et al. RAPD Analysis of genetic diversity of *Notopterygium incisum* in Sichuan[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 2008, **39**(9): 1 387—1 392 (in Chinese).
- [23] ZAWKO G, KRAUSS S L, DIXON K W, et al. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae)[J]. *Molecular Ecology*, 2001, **10**(10): 2 389—2 396.
- [24] WANG J(王 静), ZHANG X P(张小平), LI W L(李文良), et al. Genetic diversity and genetic variation of populations endangered tree *Cercidiphyllum japonicum*[J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), 2010, **30**(2): 208—214 (in Chinese).
- [25] HAMRICK J L, GODT M J. Allozyme diversity in plant species[J]. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, 1990: 43—63.
- [26] QIAN W(钱 韦), GE S(葛 颂), HONG D Y(洪德元). Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs[J]. *Journal of Integrative Plant Biology* (植物学报·英文版), 2000, **42**(7): 741—750 (in Chinese).
- [27] WANG X Q(汪小全), LIU ZH Y(刘正宇). Assessment of genetic variation of *Cathaya argyrophylla* detected by RAPDs[J]. *Science in China, Ser. C* (中国科学·C 辑), 1996, **26**(5): 436—441.
- [28] LIU ZH L(刘占林), ZHANG G F(赵桂仿). Population genetics and its implications for conservation of rare and endangered plants[J]. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), 1999, **7**(4): 340—346 (in Chinese).
- [29] SAGNARD F, BARBEROT C, FADY B. Structure of genetic diversity in *Abies alba* Mill. from southwestern Alps: multivariate analysis of adaptive and non-adaptive traits for conservation in France[J]. *Forest Ecology and Management*, 2002, **157**(1—3): 175—189.
- [30] FRANKLIN I R. *Evolutionary Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*[M]. Sinauer Associates, Massachusetts, 1980: 135—150.
- [31] ROWE G, BEEBEE T J C, BURKE T. Phylogeography of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: genetic differentiation of native and translocated populations[J]. *Molecular Ecology*, 1998, **7**(6): 751—760.
- [32] ELLSTRAND N C, ELAM D R. Population genetic consequences of small population-size-implications for plant conservation[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1993, **24**: 217—242.
- [33] GE X J, ZHANG L B, YUAN Y M, et al. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by inter-simple sequence repeats (ISSR)[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2005, **14**(4): 849—861.
- [34] LEI Y D, GAO H, TSERING T, et al. Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2006, **29**(2): 339—344.
- [35] LIU J M, WANG L, GENG Y P, et al. Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Genetica*, 2006, **128**(1—3): 385—394.
- [36] HOGGIN P M, PEAKALL R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*[J]. *Conservation Biology*, 1999, **13**(3): 514—522.
- [37] FISCHER M, HUSI R, PRATI D, et al. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2000, **87**(8): 1 128—1 137.
- [38] HAMRICK J L, GODT M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1996, **351**(1 345): 1 291—1 298.