

滇牡丹天然居群的遗传多样性分析

任秀霞, 张 盈, 薛璟祺, 朱富勇, 石丰瑞, 王顺利, 张秀新

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所/国家花卉改良中心, 北京 100081)

摘要:以云南中部及西北部的 6 个滇牡丹 (*Paeonia delavayi*) 天然居群为研究对象, 进行株高、新枝长等 9 个表型性状的表型多样性分析和 ISSR 分析。结果表明: 9 个表型性状变异幅度为 0.9% ~ 39.8%, 平均值达到了 18.9%; 居群间生殖器官的变异较大, 居群内营养器官更容易产生变异。利用居群间欧式距离进行聚类分析, 6 个居群聚为 4 个类群, 没有与实际地理位置相吻合, 说明表型特征的性状与地理距离的相关性不大。遗传多样性分析结果表明: 利用筛选得到的 10 条引物, 在取自 6 个自然居群、180 个个体中, 检测到 56 个多态位点。在居群水平上, 多态位点百分率 (PPB) 为 60.2%, Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 信息指数 (I) 分别为 0.281 和 0.414。在物种水平上, Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 信息指数 (I) 分别为 0.409 和 0.596。居群间的遗传分化系数 (G_{st}) 达 0.319。结果显示, 表型性状在居群间和居群内均存在广泛变异。滇牡丹遗传多样性水平较高, 居群间遗传分化较大, 滇牡丹并不濒危。

关键词: 滇牡丹; 居群; 多样性; 居群遗传结构; 遗传分化

Genetic Diversity Analysis of Natural Populations in *Paeonia delavayi*

REN Xiu-xia, ZHANG Ying, XUE Jing-qi, ZHU Fu-yong, SHI Feng-rui, WANG Shun-li, ZHANG Xiu-xin

(The Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/

National Center for Flower Improvement, Beijing 100081)

Abstract: The diversity of nine phenotypic traits and ISSR analysis in six natural populations of *Paeonia delavayi* were studied in this work. The results revealed that abundant variations of all phenotypic traits occurred among and within populations. The coefficient of variation (CV) of nine phenotypic traits ranged from 0.9% to 39.8%, with 18.9% of the mean value. Variation of reproductive organs was larger than that of vegetative ones among populations, while variation of vegetative organs was easily occurred compared with reproductive organs variation within populations. Euclidean clustering analysis showed that the six natural populations could be clustered into four groups. It was indicated that variation of phenotypic traits did not correspond to geography distance. 56 ISSR polymorphic loci were amplified from 180 individuals of 6 natural populations by 10 useful primers. Of them, the value of PPB, H and I was 60.2%, 0.281 and 0.414, respectively, at population level, while the value of H and I was 0.409 and 0.596, respectively at species level. The G_{st} (0.319) indicated a high degree of genetic differentiation occurred among *P. delavayi* populations. The results of genetic diversity study, combined with field survey and previous investigations suggest that *P. delavayi* is not endangered.

Key words: *Paeonia delavayi*; populations; diversity; population genetic structure; genetic differentiation

滇牡丹 (*Paeonia delavayi*) 是我国西南地区特有的牡丹种, 主要分布于云南中部至西北部、四川西南

部和西藏东南部等地, 研究其居群分布对于明确芍药属的起源、演化、地理分布等具有重要的学术价

收稿日期: 2014-09-11 修回日期: 2014-10-20 网络出版日期: 2015-06-23

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150623.0901.004.html>

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目 (2013-2014); 中国农业科学院院所基金项目 (2014JB02-001); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201203071); 国家“863”计划项目 (2011AA10020703); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

第一作者研究方向为花卉资源与育种。E-mail: 1203476513@qq.com; 张盈为共同第一作者

通信作者: 张秀新, 研究方向为花卉资源与育种。E-mail: zhangxiuxin@caas.cn

值^[1,2]。同时,滇牡丹花色丰富,也是培育黄色和紫色栽培牡丹品种的重要育种材料^[3]。自 1886 年以来,各国育种家陆续将滇牡丹引种到法国、英国、美国等地,并利用其花色资源培育出了一批优良的黄、紫色品种,如金帝、金阳、中国龙、黑海盗等。虽然关于滇牡丹的分类地位目前尚有争议^[4],但经过多年的野外调查和分析研究,很多学者基本认可基于花色和叶裂片宽度等性状划分的分类方法,将另外分类系统中的黄牡丹、紫牡丹、狭叶牡丹统归为滇牡丹^[5-6],本研究采用的就是这种分类方法。不管滇牡丹划分是否存在争议,但它所具有的科研和应用价值已得到了研究者的一致认可^[7]。

表型多样性是遗传多样性与环境多样性的综合体现,利用表型性状差异研究居群的遗传多样性具有简便、快速和成本低等优点^[8-9],而遗传多样性是生物多样性的核心(一般指种内的遗传多样性),形态标记受环境影响较大,遗传表达有时不太稳定。在表型多样性方面,目前已在大蒜^[10]、甘蔗^[11]、紫丁香^[12]、腊梅^[13]、岷江百合^[14]、云南红花^[15]等方面开展了多项研究,并通过表型性状的差异估测了遗传变异。一些学者在滇牡丹的分类学、地理分布及生态环境、形态多样性、细胞学(染色体多样性)、分子标记多样性等领域开展了研究^[2],发现滇牡丹存在丰富的遗传多样性。周波等^[16]对不同国别来源的牡丹栽培品种开展了形态多样性分析,发现不同国别之间存在较大的遗传差异。在分子标记方面,目前应用较多的包括 SSR^[17]、EST-SSR^[18]、SRAP^[19-20]等。同时,也有学者利用分子标记结合表型性状开展了遗传多样性研究,但主要集中在水稻、大豆等农作物方面^[21-23]。在观赏植物方面,两者结合的研究相对较少。

表 1 采样居群地理分布情况

Table 1 Geographical and distribution scales at collection localities of populations

| 居群代号 Population No. | 地点 Origin | 经纬度 Locality | 海拔(m) Altitude | 生境 Habitat |
|------------------------|--------------|---------------------|-------------------|---|
| LWS | 澄江梁王山 | 24°45'N 102°54'E | 2763 | 石灰质棕壤,石灰岩占 50%,土层瘠薄,中山坡面 |
| HDX | 大理海东乡 | 25°41'N 100°20'E | 2505 | 石灰质红壤,石灰岩占 50%,土层瘠薄,中山坡面 |
| YLXS | 丽江玉龙雪山 | 27°06'N 100°13'E | 2900 ~ 3400 | 棕壤和暗棕壤土壤为森林土,土壤肥沃,高山峡谷中部 平地 and 坡面 |
| XYX | 香格里拉新阳乡 | 28°02'N 99°30'E | 3362 | 棕色森林土有少量石砾,中山坡面 |
| NXX | 香格里拉尼西乡 | 27°56'N 99°35'E | 3341 | 棕色森林土,谷底坡面石砾裸露面积达 70%,谷底平地 无石砾,高山峡谷谷底平地 and 坡面 |
| NPH | 香格里拉纳帕海 | 27°55'N 99°37'E | 3314 | 河岸冲积层上的棕色森林土偶有石砾,土层深厚,高山 峡谷谷底 |

就牡丹而言,由于目前对其 DNA 序列信息了解较少,难以进行大规模的 SSR 引物开发,而 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats,简单重复序列间隔区)技术可以在没有 DNA 信息背景的条件下开展遗传资源评价和品种分类等工作,且不易受环境条件的影响^[24],是研究牡丹遗传多样性的很好的工具。研究者先前结合前人的工作基础^[25-27],开发了适宜牡丹的 ISSR 分子标记系统^[28-29]。本研究在系统调查的基础上,选取具有一定居群规模、人为破坏较小的 6 个滇牡丹野生居群,采用遗传较为稳定、不易受环境影响的性状研究表型多样性,开展表型变异调查研究,摸清种内主要变异类型,揭示居群变异类型间的遗传规律,为滇牡丹参与牡丹育种提供指导。同时通过 ISSR 分子标记技术,了解该物种的表型变异规律与遗传多样性的关系,并从遗传多样性和遗传结构方面探讨滇牡丹的现状,为其种质资源的保护与开发应用提供基础资料。这些结果可为筛选优良变异、建立核心种质、制定滇牡丹资源保护和利用策略提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究分别于 2008 年 5 月和 9 月对滇牡丹居群进行了调查和取样。选择 6 个相对隔离的滇牡丹天然居群(表 1),在选定的居群内以无性系为单位随机选择 30 个生长良好、无明显病虫害的单株,作为样本,要求样本间距大于 2 m,居群间距大于 1 km。在同一居群内选取典型茎、叶、花等进行个体数据采集,采集叶片经硅胶干燥以后,带回实验室再用真空干燥机进行二次彻底干燥,并储存于 -80 ℃ 冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 表型性状的测定 随机选取成年植株 10 株,用直尺测量植株的株高(从地面到最高一朵花的距离)、新枝长(当年生新枝底部到新枝顶端的距离)取平均数;从每个采集植株的上、中、下部随机抽取 5 片叶子(上下部各一片,中间 3 片)测定其叶长和叶宽;随机抽取 5 朵花测量花径(花横径)和花高(花纵径);随机抽取 20 粒种子用游标卡尺测量种长、种宽;每株抽取 10 粒种子测其重量(因野生牡丹结实率低),重复 2 次,取平均值换算成千粒重。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法^[30]提取基因组 DNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量,并在紫外分光光度计(Brim-IOA-0004)下检测其浓度,最后稀释标定到 10 ng/ μ L,放入 -20 °C 冰箱里储存备用。

1.2.3 ISSR-PCR 反应 PCR 反应在 Bio-Rad 公司的 PTC-200 型 PCR 仪上进行,经过比较和优化确定最佳的 ISSR 扩增条件为 10 μ L 的反应体系,内含 2 \times PCR Master Mix 5 μ L(北京博大泰恒);10 ng/ μ L 模板 DNA 1 μ L;10 μ mol/L 引物 1 μ L(北京三博远志);ddH₂O 3 μ L。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,48 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1.5 min,38 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。

1.2.4 产物检测 扩增产物用 0.5 \times TBE 缓冲液配制的 2.0% 琼脂糖凝胶分离,Goldview II 染色剂染色,在 100 V 的电压下电泳 1 h,Marker 使用 DL2000 (Takara Biotec)。用 Bio-Rad 公司的 Gel-2000 凝胶成像系统观察、记录、保存图像。

1.2.5 统计方法与参数 表型多态性数据分析用单因素方差分析、均值和多重比较研究居群间的差异,对多重比较结果进行统计。研究 6 个居

群差异的大小,用变异系数研究性状的离散程度。使用 SPSS12.0 进行主成分分析和聚类分析,研究滇牡丹变异的主要组成因素以及探讨变异原因。主成分分析是一种通过降维,将多个指标简化为少数几个综合指标,这几个少数综合指标可以反映原来所有指标的信息的多元分析方法。主成分分析还可以提供有关性状间相关性的信息,以及某一综合性状在分类中的意义及其对分类的影响程度等多种信息。聚类分析数据采用标准化变换,相似性系数计算采用欧氏距离系数,采用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析。

遗传多态性数据分析 按照电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,仅记录清晰、稳定且长度在 200 ~ 1000 bp 范围内的扩增带,形成 0/1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE1.32 软件在假定居群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下,对全部居群和各单个居群分别进行遗传参数分析,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 基因多样性指数(H)、Shannon's 信息指数(I)、居群总基因多样性(H_t)、居群内基因多样性(H_s)、居群间的遗传分化系数(G_{ST})、基因流值(N_m)、Nei's 遗传距离(D)和遗传一致度(I)。根据 Nei's 遗传距离,利用 NTSYS2.1 软件对居群进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 表型性状的方差分析、均值和多重比较

本试验共调查了 6 个天然居群的 180 个单株。通过对每个单株 9 个表型性状的方差分析表明,这些性状在居群间均存在极显著的差异(表 2)。

表 2 滇牡丹 6 个天然居群表型性状的方差分析

Table 2 Variation analysis of phenotypic traits of *P. delavayi* in six natural populations

| | 株高 PH | 新枝长 FBL | 叶长 LL | 叶宽 LW | 花径 FD | 花高 FH | 种长 SL | 种宽 SW | 千粒重 W1000 |
|-----------------------------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------|
| 居群间 Among populations | 57.18 ** | 5.79 ** | 24.37 ** | 20.39 ** | 48.24 ** | 33.96 ** | 14.94 ** | 5.58 ** | 48.79 ** |

* 表示在 0.05 水平上差异达到显著性; ** 表示在 0.01 水平上差异达到显著性

* means significant difference at 0.05 levels; ** means significant difference at 0.01 levels. PH: Plant height, FBL: Fresh-branch length, LL: Leaf length, LW: Leaf width, FD: Flower diameter, FH: Flower height, SL: Seed length, SW: Seed width, W1000: 1000-grain weight. The same as below

居群间表型性状的均值比较和多重比较结果表明,这些性状的最大值均为玉龙雪山居群,而最小值分属于其他不同居群,如株高最小值出现在新阳乡居群,花径和花高最小值出现在海东乡居群,而千粒重最小值则出现在梁王山居群(表3)。由此可见,滇牡丹各表型性状在居群间的变异不均衡。

表3 滇牡丹6个天然居群表型性状的平均值、标准差以及多重比较

Table 3 The mean value and standard deviation of phenotypic traits of *P. delavayi* in six natural populations

| 表型性状 Phenotypic traits | 居群代号 Population code | | | | | | 平均 Average |
|---------------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | LWS | HDX | YLXS | XYX | NXX | NPH | |
| 株高(cm)PH | 57.60 ± 14.95Cc | 61.52 ± 16.83Cc | 141.10 ± 47.37Aa | 37.70 ± 9.46Dd | 92.78 ± 22.75Bb | 105.82 ± 33.81Bb | 82.75 ± 37.82 |
| 新枝长(cm)FBL | 16.65 ± 7.81Bb | 21.29 ± 8.64ABa | 25.19 ± 11.34Aa | 21.90 ± 9.47ABa | 23.42 ± 5.41Aa | 15.97 ± 6.38Bb | 20.74 ± 3.69 |
| 叶长(cm)LL | 27.45 ± 3.98Dc | 28.60 ± 5.10CDc | 36.20 ± 5.42Aa | 31.45 ± 4.58BCb | 32.59 ± 3.44Bb | 23.83 ± 5.65Ed | 30.02 ± 4.33 |
| 叶宽(cm)LW | 21.33 ± 3.07Ab | 21.43 ± 4.96Ab | 24.20 ± 5.41Aa | 21.73 ± 4.72Ab | 22.66 ± 3.34Aab | 14.28 ± 3.05Bc | 20.94 ± 3.43 |
| 花径(cm)FD | 6.65 ± 1.09BCc | 5.03 ± 1.06De | 9.76 ± 1.90Aa | 6.80 ± 0.84Ccd | 7.35 ± 1.08BCc | 8.11 ± 1.22Bb | 7.28 ± 1.58 |
| 花高(cm)FH | 3.32 ± 0.51Bb | 3.14 ± 0.50Bb | 6.38 ± 2.61Aa | 3.52 ± 0.40Bb | 3.58 ± 0.33Bb | 3.78 ± 0.40Bb | 3.95 ± 1.21 |
| 种长(mm)SL | 12.25 ± 0.63Ccd | 12.13 ± 0.76Ccd | 15.75 ± 1.06Aa | 11.77 ± 2.07Cc | 12.85 ± 2.04Bb | 11.75 ± 0.72Cd | 12.75 ± 1.52 |
| 种宽(mm)SW | 10.98 ± 0.65Cb | 11.25 ± 0.96BCb | 12.83 ± 1.20Aa | 10.05 ± 2.74BCb | 11.30 ± 2.33ABa | 10.92 ± 1.16Cb | 11.22 ± 0.91 |
| 千粒重(g)W1000 | 503.54 ± 73.21Cc | 544.30 ± 46.89Cc | 849.44 ± 97.37Aa | 523.94 ± 47.03Cc | 753.46 ± 23.36Bb | 539.87 ± 40.96Cc | 619.10 ± 145.18 |

小写字母表示在 0.05 水平上差异达到显著性;大写字母表示在 0.01 水平上差异达到显著性

Lowercase means significant difference at 0.05 levels; Capital letters mean significant difference at 0.01 levels

多重比较结果表明,在达到显著水平差异的总数中,玉龙雪山居群最多,为 40 个,而梁王山居群、海东乡居群和新阳乡居群均为 24 个,总数最少(表4);在达到极显著水平差异的总数中,玉龙雪山居群依然最多,为 37 个,新阳乡居群最少,为 18 个。因此,玉龙雪山居群与其他 5 个居群表型差异最大,梁王山、海东乡、新阳乡 3 个居群之间表型差异最小。

表4 6个天然居群表型性状多重比较结果的统计

Table 4 Multiple comparisons of phenotypic traits in six natural populations

| 居群代号 Population code | 比较总数* Total of comparisons | 差异统计 | |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Summary statistics significance | |
| | | 显著水平 5% Level | 极显著水平 1% Level |
| LWS | 45 | 24 | 21 |
| HDX | 45 | 24 | 19 |
| YLXS | 45 | 40 | 37 |
| XYX | 45 | 24 | 18 |
| NXX | 45 | 28 | 26 |
| NPH | 45 | 33 | 27 |

* 比较总数=9(进行比较的表型性状数目)×5(进行比较的居群数目)

Total of comparisons = 9 (Number of phenotypic traits compared) × 5 (Number of populations compared)

2.2 表型性状的变异系数分析

变异系数可以反映表型性状在居群间和居群内的变异,变异系数越大,则性状值离散程度越大。通过对所调查居群表型性状变异系数的分析表明:(a)从 9 个性状来看,居群间株高、千粒重、花高、花径、新枝长等表型性状差异显著,变异系数较大,变幅为 17.8%~45.7%;居群内新枝长、株高、叶宽等表型性状差异显著,变异系数均值较大,变幅为 19.6%~39.8%。(b)从 6 个居群来看,玉龙雪山平均变异系数最大,为 22.6%,尼西乡居群平均变异系数最小,为 15.2%。(c)从单个表型性状来看,除了尼西乡居群外,其他 5 个居群均有变异系数最大的单个表型性状(表5)。综合以上结果,各表型性状在居群间和居群内的变异有所不同,这些差异反映出了不同性状对环境变化的敏感程度不同。

2.3 表型性状的聚类分析

结果显示,6 个居群在遗传距离 2.14 处被分为 4 个类群,梁王山、海东乡和新阳乡被聚为 1 个类群,尼西乡、纳帕海和玉龙雪山均单独为 1 个类群(图1)。6 个居群表型性状特征并没有依地理距离而聚类,说明了居群间表型性状变异的不连续性。

表 5 滇牡丹表型性状的变异系数

| 表型性状 Phenotypic traits | 居群内 Within populations | | | | | | | 居群间 Among populations |
|---------------------------|------------------------|------|------|------|------|------|---------------|-----------------------------|
| | LWS | HDX | YLXS | XYX | NXX | NPH | 平均 Average | |
| 株高 PH | 26.0 | 27.4 | 33.6 | 25.1 | 24.5 | 32.0 | 28.1 | 45.7 |
| 新枝长 FBL | 46.9 | 40.6 | 45.0 | 43.3 | 23.1 | 39.9 | 39.8 | 17.8 |
| 叶长 LL | 14.5 | 17.8 | 15.0 | 14.6 | 10.5 | 23.7 | 16.0 | 14.4 |
| 叶宽 LW | 14.4 | 23.1 | 22.4 | 21.7 | 14.8 | 21.4 | 19.6 | 16.4 |
| 花径 FD | 16.4 | 21.2 | 19.5 | 12.5 | 14.7 | 15.1 | 16.6 | 21.7 |
| 花高 FH | 15.3 | 15.9 | 40.9 | 11.5 | 9.3 | 10.7 | 17.3 | 30.6 |
| 种长 SL | 5.2 | 6.2 | 6.7 | 17.6 | 15.9 | 6.1 | 9.6 | 11.9 |
| 种宽 SW | 5.9 | 8.5 | 9.4 | 27.3 | 20.6 | 10.6 | 13.7 | 8.1 |
| 千粒重 W1000 | 14.5 | 8.6 | 11.4 | 9.0 | 3.2 | 7.5 | 9.0 | 23.5 |
| 平均 Average | 17.7 | 18.8 | 22.6 | 20.3 | 15.2 | 18.6 | 18.9 | 21.1 |

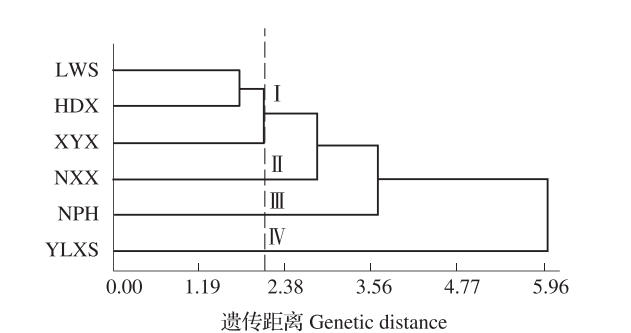


图 1 滇牡丹天然居群表型性状的聚类结果
Fig. 1 Clustering dendrogram of phenotypic traits of *P. delavayi* in natural populations

2.4 表型性状的主成分分析

对滇牡丹的表型性状进行主成分分析,结果表明:前 2 个成分特征值的累计贡献率达到了 91.03%,足以反映原始因子所代表的绝大部分信息(表 6)。其中第 1 主成分对株高、花径、花高、种长、种宽、千粒重 6 个表型性状有绝对值较大的负荷系数,第 2 主成分负荷系数绝对值较大的为叶宽、叶长、新枝长(表 7)。以上结果说明,9 个表型性状均为滇牡丹表型变异的主要构成因素。这些性状中,第 1 主成分主要反映了花、种子等生殖器官表型性状引起的变异,第 2 主成分主要反映了茎、叶等营养器官表型性状引起的变异。同时,第 1 主成分的特征值贡献率(51.67%)大于第 2 主成分的特征值贡献率(39.36%)。

表 6 各主成分的公因子方差表

| 因子 Component | 初始特征值 Initial eigenvalues | | | 旋转后的特征值 Rotation sums of squared loadings | | |
|-----------------|---------------------------|------------|------------|---|------------|------------|
| | 总特征值 | 特征值(%) | 累计特征值(%) | 总特征值 | 特征值(%) | 累计特征值(%) |
| | Total eigenvalue | Eigenvalue | Cumulative | Total eigenvalue | Eigenvalue | Cumulative |
| 1 | 6.30 | 70.05 | 70.05 | 4.65 | 51.67 | 51.67 |
| 2 | 1.89 | 20.98 | 91.03 | 3.54 | 39.36 | 91.03 |
| 3 | 0.41 | 4.53 | 95.56 | | | |
| 4 | 0.29 | 3.21 | 98.77 | | | |
| 5 | 0.11 | 1.23 | 100 | | | |
| 6 | 5.99E-16 | 6.66E-15 | 100 | | | |
| 7 | 1.6E-16 | 1.78E-15 | 100 | | | |
| 8 | -6.3E-17 | -7E-16 | 100 | | | |
| 9 | -6.4E-16 | -7.1E-15 | 100 | | | |

表 7 表型性状因子的载荷矩阵

Table 7 Component matrix(a)

| 性状 Traits | | 株高 PH | 花径 FD | 花高 FH | 种宽 SW | 种长 SL | 千粒重 W1000 | 叶宽 LW | 叶长 LL | 新枝长 FBL |
|-----------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|--------------|----------|----------|------------|
| 因子 Component | 1 | 0. 976 | 0. 913 | 0. 885 | 0. 827 | 0. 803 | 0. 748 | 0. 004 | 0. 348 | 0. 265 |
| | 2 | 0. 018 | 0. 039 | 0. 360 | 0. 371 | 0. 562 | 0. 591 | 0. 966 | 0. 921 | 0. 909 |

2.5 遗传多态位点分析

从加拿大温哥华哥伦比亚大学开发的 100 个 ISSR 引物,以及文献中提到的引物^[25-27]进行筛选,筛选出能获得清晰条带、稳定性和重复性好且相对较多条带的 10 个引物用于全部样品的 PCR 扩增。根据不同居群在同一位点频率的差异,统计了 6 个居群的总条带数及多态性条带数。10 条引物共扩

增出 93 个位点,多态位点数为 56,多态位点百分率(PPB)为 60.2%。其中多态位点百分率最高的是编号为 S5 的引物对 6 个居群的扩增产物,为 70%;最低的是编号为 S8 的引物,为 50%。单条扩增条带数为 8~10 条,平均为 9.3 条(表 8)。扩增片段长度介于 300~1800 bp 居多。

表 8 ISSR 分析所用引物序列和扩增结果

Table 8 The primers alignment and amplified results of ISSR analysis

| 引物编号 Code of the primer | 引物序列 Primer(5'-3') | 总条带数 Total number of bands | 多态性带数 The number of polymorphism bands | 多态带百分率 (%) PPB |
|----------------------------|------------------------|-------------------------------|---|----------------------|
| U836 | AGAGAGAGAGAGAGGYA | 8 | 5 | 62.5 |
| S3 | GGAGAAGCAGCAGCAGCAGC | 10 | 6 | 60 |
| S5 | AGTGACTGACTGACTG | 10 | 7 | 70 |
| U866 | CTCCTCCTCCTCCTCCTC | 9 | 5 | 55.6 |
| U899 | CATGGTGTTGGTCATTGTTCCA | 10 | 6 | 60 |
| U854 | TCTCTCTCTCTCTCTCRG | 8 | 5 | 62.5 |
| S8 | CTCTCTCTCTCTCTCTRG | 10 | 5 | 50 |
| S9 | CTCCTCCTCCTCRC | 10 | 6 | 60 |
| U835 | AGAGAGAGAGAGAGAGYC | 9 | 6 | 66.7 |
| U823 | TCTCTCTCTCTCTCTCC | 9 | 5 | 55.6 |
| 平均 | | 9.3 | 5.6 | 60.2 |

Y = C,T;R = A,G

2.6 遗传多样性分析

对滇牡丹 6 个自然居群共 180 个个体的居群遗传分析表明:总体而言,滇牡丹的遗传多样性水平较高。由 POPGENE1.32 计算得到,在物种水平上,观测等位基因数(N_a)为 2.000,有效等位基因数(N_e)为 1.721($SD = 0.224$),Nei's 基因多样性(H)为 0.409($SD = 0.082$),Shannon's 信息指数(I)为 0.596($SD = 0.089$)。在居群水平上,平均每个位点

的观测等位基因数(N_a)为 1.949($SD = 0.092$),平均每个位点的有效等位基因数(N_e)为 1.717($SD = 0.319$),Nei's 基因多样性(H)平均为 0.281($SD = 0.161$),Shannon's 信息指数(I)为 0.414($SD = 0.222$)。此外,居群平均水平的各遗传多样性参数均低于物种水平。而且,Nei's 基因多样性(H)与 Shannon's 信息指数(I)估计的各居群内平均遗传多样性的高低顺序一致(表 9)。

表 9 滇牡丹天然居群内的遗传多样性

Table 9 Genetic diversity of *P. delavayi*

| 居群 | 等位基因数 | 有效等位基因数 | Nei's 基因多样性 | Shannon's 信息指数 |
|------------------------|----------------------|----------------------|---------------|----------------|
| Population | <i>N_a</i> | <i>N_e</i> | <i>H</i> | <i>I</i> |
| YLXS | 1.696 ± 0.464 | 1.415 ± 0.363 | 0.245 ± 0.195 | 0.366 ± 0.278 |
| LWS | 2.000 ± 0.000 | 1.778 ± 0.155 | 0.433 ± 0.053 | 0.623 ± 0.057 |
| HDX | 1.679 ± 0.471 | 1.426 ± 0.394 | 0.243 ± 0.208 | 0.359 ± 0.292 |
| XYX | 1.500 ± 0.505 | 1.337 ± 0.404 | 0.189 ± 0.214 | 0.277 ± 0.309 |
| NPH | 1.982 ± 0.137 | 1.667 ± 0.242 | 0.386 ± 0.101 | 0.568 ± 0.123 |
| NXX | 1.625 ± 0.489 | 1.321 ± 0.358 | 0.192 ± 0.195 | 0.292 ± 0.278 |
| 在物种水平 At species level | 2.000 ± 0.000 | 1.721 ± 0.224 | 0.409 ± 0.082 | 0.596 ± 0.089 |
| 平均值 Mean | 1.949 ± 0.092 | 1.717 ± 0.319 | 0.281 ± 0.161 | 0.414 ± 0.222 |

自然居群内基因多样性值 (H_s) 和总基因多样性值 (H_t) 分别为 0.281 和 0.413, 根据遗传多样性水平在居群内 (H_s) 和居群间 (H_t-H_s) 的分化, 各个居群之间的 Nei's 基因分化系数 ($G_{st} = (H_t-H_s)/H_t$) 是 0.319。这说明在物种水平上, 有 68.13% 的遗传变异存在于居群内, 而 31.87% 的遗传变异存在于居群间, 居群之间表现出较高水平的遗传分化。

2.7 遗传距离与聚类分析

通过估算 6 个滇牡丹居群间的遗传距离 (表 10), 使用 UPGMA 聚类法得出树形图 (图 2)。结果表明, 6 个滇牡丹居群间的 Nei's 遗传距离都较小, 表明其地理亲缘很近, 遗传距离变化在 0.098 ~ 0.343。共被分为 4 个类群, 其中梁王山和纳帕海两个居群的遗传距离最近 (0.098), 单独聚为一组; 玉龙雪山与海东乡两个居群次之, 为 0.107, 聚为一组; 新阳乡与玉龙雪山和海东乡的遗传距离分别为 0.162 和 0.139; 而尼西乡与玉龙雪山、海东乡、新阳乡的遗传距离分别为 0.257、0.175 和 0.165。6 个居群并没有依地理距离而聚类, 说明了居群间遗传性状变异的不连续性。

表 10 滇牡丹天然居群的 Nei's 遗传一致度 (I) (右上角) 和遗传距离 (D) (左下角)

Table 10 Nei's genetic identity and genetic distance of *P. delavayi*

| 居群 | YLXS | LWS | HDX | XYX | NPH | NXX |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Population | | | | | | |
| YLXS | **** | 0.709 | 0.899 | 0.850 | 0.711 | 0.774 |
| LWS | 0.343 | **** | 0.723 | 0.740 | 0.907 | 0.720 |
| HDX | 0.107 | 0.325 | **** | 0.870 | 0.732 | 0.839 |
| XYX | 0.162 | 0.301 | 0.139 | **** | 0.724 | 0.848 |
| NPH | 0.341 | 0.098 | 0.312 | 0.323 | **** | 0.685 |
| NXX | 0.257 | 0.329 | 0.175 | 0.165 | 0.379 | **** |

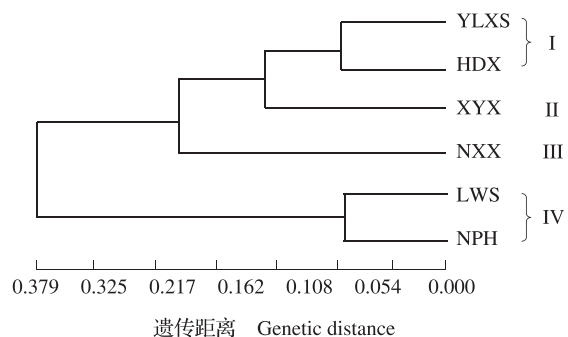


图 2 滇牡丹的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of populations of *P. delavayi* based on Nei's (1972) genetic distance

3 讨论

形态多样性是遗传多样性的表现形式之一。通过对表型变异系数和主成分分析发现, 6 个天然居群性状变异极为丰富, 其变异幅度在 0.9% ~ 39.8% 之间, 平均值为 18.9%, 高于腊梅 (15.2%)^[13]、青海云杉 (11.2%)^[31], 略低于白木香 (19.5%)^[32]。研究还发现, 本研究涉及的 9 个表型性状共同参与了滇牡丹居群间和居群内的丰富变异, 均为表型变异的主要因素。通过植株生长状况 (株高、新枝长、叶长、叶宽等) 和开花结实特性 (花径、花高、千粒重等) 等调查发现, 滇牡丹存在极高的遗传多样性。其中, 居群间生殖器官容易产生变异, 如花径、花高等 (表 2); 居群内营养器官更易产生变异, 如新枝长等 (表 5)。居群间的表型变异可能主要与其遗传基础有关, 而居群内的遗传变异则可能是长期环境变异的结果。研究表明, 植物的遗传多样性与其分布范围有着密切的关联性^[33], 滇牡丹居群间的地理距离普遍较大, 使得野生居群间进行基因交流存在困难; 另一方面, 调查中发现, 滇牡丹无性繁殖能力很强, 而且种子受虫害等破坏非常严重, 这些结果共同造成

了滇牡丹有性繁殖量非常低,主要靠无性繁殖方式繁育后代。由于无性繁殖的扩散能力较弱,不能远距离扩散,这也是居群之间不能进行基因交流的原因之一。

居群的遗传结构从一定意义上可以说是基因流动和遗传漂变两种因素共同作用的结果^[34]。一般认为基因流动 $Nm = 1$ 即可防止因遗传漂变引起的遗传分化^[35]。滇牡丹野生居群内的野生分化表明其存在异质性亚结构,6 个居群基因流动 (Nm) 为 1.069,高于自交种居群的基因流水平,而低于一般广布种的基因流动水平 ($Nm = 1.881$)。6 个居群间有一定遗传分化,不同居群间存在一定程度的基因交流,为了明确这一点,通过基因的聚类分析揭示了不同地域居群的亲缘关系。ISSR 标记结果表明,本研究的 6 个居群共被分为了 4 个类群,其中梁王山和纳帕海两个居群单独聚成一组,玉龙雪山与海东乡两个居群次之,也聚成一组。6 个居群并没有根据地城远近进行聚类,说明了居群间遗传性状变异存在不连续性。本研究滇牡丹 PPB 为 60.2%,表明滇牡丹的遗传多样性较高。与一些其他稀有和濒危的物种相比,遗传多样性并不低,比一些典型濒危植物的多态位点百分率也要高得多。对自然居群内基因多样性值 (H_s) 和总基因多样性值 (H_t) 进行分析表明:在物种水平上,有 68.13% 的遗传变异存在于居群内,而 31.87% 的遗传变异存在于居群间,居群之间表现出较高水平的遗传分化。

杨淑达等^[27]利用 ISSR 对滇牡丹的遗传多样性进行了系统分析,发现滇牡丹在居群水平上 PPB 为 44.61%,而在物种水平上达到了 79.31%,表明滇牡丹遗传多样性水平较高,居群间遗传分化较大,但这些研究未涉及表型性状分析。在本研究中,结合表型性状和分子标记结果,对上述结果进行了有效补充,并发现了环境和自身因素对影响滇牡丹遗传多样性的相同点及差异。调查中前人文献记载的部分居群虽已遭到人为破坏,但在尚保存完好的这 6 个典型居群中,居群表型变异依然极为丰富,同时不同地域的类群间出现了较高水平的遗传分化。这些变异和分化表明自身遗传和环境因素共同决定了滇牡丹的遗传多样性。研究中还发现,梁王山和纳帕海两个居群,不论是表型性状聚类还是 UPGMA 聚类,都很好的聚在了一起,表明这两个类群的亲缘关系较近,支持了 D. Y. Hong 等^[36]将原分类群归为一个种的处理。而其他几个类群的 UPGMA 聚类与表型结果不完全一致,这可能是长期受环境影响导致。

如玉龙雪山居群,在表型性状方面与其他居群相距较远,而 UPGMA 聚类则与海东乡较为相近。玉龙雪山为高山保护区,其垂直气候差异明显,又受到了人为因素的影响,这可能是造成其表型性状特异的主要原因,而这些变化可能主要体现在蛋白表达等方面,在 DNA 层面还没有显著变化。这一结果是环境影响植物表型变异的一个典型例子,也表明了表型性状结合分子标记共同分析的必要性。从进化上分析,这种多层次的变异为优质种质资源和生物多样性保护提供了物质基础。

本研究表明,滇牡丹具有较高水平的遗传多样性。大部分居群数量都维持在较高的水平,各个居群的植株生长繁衍良好,没有一处灭绝。本研究支持前人对滇牡丹野生状况评估的观点^[2,27],即滇牡丹拥有较高的遗传、生境和形态的多样性,具有较强的适应能力和进化潜力,并不处于濒危境地;被列为国家三级保护植物主要是强调其地理分布区的狭小及研究和应用价值。实际调查中部分滇牡丹居群的灭绝主要是人为造成的生境破坏和滥挖滥采。因此,在开展滇牡丹保护工作中,地方政府及林业部门应把工作重心放到加强管理,建立自然保护区,保护野生种质资源方面,同时应加强宣传,提高人民群众对自然资源的保护意识。在资源保存方面,以在原始生长地进行保存为主,在有条件的情况下建立异地保存种质资源圃,并选取具有各种优良性状的单株进行异地保存。最后,对具有优良性状的单株可通过基因型鉴定,建立种质基因库。

参考文献

- [1] 洪德元,潘开玉. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理[J]. 植物分类学报,1999,37(4):351-368
- [2] 龚洵,潘跃芝,杨志云. 滇牡丹的多样性和现状评估[J]. 西北植物学报,2003,23(2):218-223
- [3] 成仿云,李嘉珏,于玲. 中国牡丹的输出及其在国外的发展[J]. 西北师范大学学报:自然科学版,1998,34(3):103-108
- [4] 成仿云,李嘉珏,陈德忠. 中国野生牡丹自然繁殖特性研究[J]. 园艺学报,1997,24(2):180-184
- [5] Hong D Y, Pan K Y. A revision of the *Paeonia suffruticosa* complex [J]. Nord J Bot, 1999, 19: 289-299
- [6] Stephen G. A review of their history taxonomy [J]. The New Plantsman, 2001, 8: 251-253
- [7] 王志芳,王雁,岳桦. 珍稀资源-黄牡丹[J]. 中国城市林业, 2007, 5(2): 59-60
- [8] 顾万春,王琪. 森林遗传资源学概论[M]. 北京:中国科学技术出版社,1998
- [9] 李文英,顾万春. 栎属植物遗传多样性研究进展[J]. 世界林业研究, 2002, 15(2): 42-49
- [10] 王海平,李锡香,沈楠,等. 基于表型性状的中国大蒜资源遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 24-31
- [11] 刘新龙,马丽,蔡青,等. 云南甘蔗品种表型性状的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 703-708

- [12] 明军,顾万春. 紫丁香表型多样性研究[J]. 林业科学研究, 2006,19(2):199-204
- [13] 赵冰,张启祥. 腊梅种质资源表型多样性[J]. 东北林业大学学报,2007,35(5):10-13
- [14] 张彩霞,明军,刘春,等. 岷江百合天然群体的表型多样性[J]. 园艺学报,2008,35(8):1183-1188
- [15] 郭丽芬,徐宁生,张跃,等. 云南红花种质资源主要农艺性状的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(2):219-225
- [16] 周波,江海东,张秀新,等. 部分引进牡丹品种的形态多样性[J]. 生物多样性,2011,19(5):543-550
- [17] 范英明,张登荣,于大德,等. 河北省华北落叶松天然群体遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(3):465-471
- [18] 张水明,陈程,陈芳芳,等. 16 个蝴蝶兰品种 EST-SSR 遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):560-564
- [19] 马红勃,赖黎英,许旭明,等. 基于 SRAP 标记的大花蕙兰种质资源遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(4):551-556
- [20] 白坚,胡旭,周淑婷,等. 47 个建兰品种的 SRAP 遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(3):376-380
- [21] 赵庆勇,张亚东,朱镇,等. 采用 SSR 标记和表型性状聚类对杂交梗稻亲本的遗传多样性研究[J]. 杂交水稻,2010,25(4):68-74
- [22] 薛德,肖亮,艾辛,等. 五节芒表型性状和 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 草业学报,2012,21(5):96-106
- [23] 秦君,张孟臣,陈维元,等. 基于分子和表型性状的大豆骨干品种遗传多样性分析[J]. 华北农学报,2013,28(1):19-26
- [24] 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,2001:1-266
- [25] 索志立,周世良,张会金,等. 杨山牡丹和牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据[J]. 林业科学研究,2004,17(6):700-705
- [26] 索志立,张会金,张治明,等. 紫斑牡丹与牡丹中间杂交后代的 DNA 分子证据[J]. 云南植物研究,2005,27(1):42-48
- [27] 杨淑达,施苏华,龚洵,等. 滇牡丹遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性,2005,13(2):105-111
- [28] 吴蕊,张秀新,薛璟祺,等. 紫牡丹远缘杂交后代幼苗的形态标记和 ISSR 标记鉴定[J]. 园艺学报,2011,38(12):2325-2332
- [29] 石颜通,周波,张秀新,等. 牡丹 89 个不同种源品种遗传多样性和亲缘关系分析[J]. 园艺学报,2012,39(12):2499-2506
- [30] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemical Bulletin,1987,9:11-15
- [31] 王娅丽,李毅,陈晓阳. 祁连山青海云杉天然群体表型性状遗传多样性分析[J]. 林业科学,2008,44(2):70-77
- [32] 赵翾,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
- [33] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. [M]//Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L et al. ed. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1990:43-63
- [34] Hutchison D W, Templeton A R. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability [J]. Evolution, 1999, 53:1898-1914
- [35] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. Science, 1987, 236:787-792
- [36] Hong D Y, Pan K Y, Yu H. Taxonomy of the *Paeonia delavayi* Complex (Paeoniaceae) [J]. Ann Mo Bot Gard, 1998, 85:554-564