

# 滇东南硬叶兜兰核心种质区群体遗传结构

李宗艳<sup>1,2</sup>, 李静<sup>2</sup>, 曾万标<sup>2</sup>, 李名扬<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; <sup>2</sup>西南林业大学园林学院, 昆明 650224)

**摘要:**本研究选硬叶兜兰国内主要种质采集区滇东南石灰岩地区 7 个不同干扰居群为研究对象, 旨在对其居群内和居群间遗传变异进行比较研究, 以期对其保护措施提出提供理论依据。通过利用 SRAP 标记对 167 个个体的遗传多样性和遗传结构研究, 结果表明: 10 对 SRAP 引物共扩增出 288 个位点, 多态性位点比率 (PPB) 达 81.25%, Shannon's 指数 ( $I$ ) 为 0.3709, 在物种水平上的具有较高遗传多样性; 而居群水平上的多态性位点比率仅为 47.92%, Shannon's 指数为 0.2348, 居群间平均 Nei's 遗传距离为 0.1268。经分子遗传变异方差分析 (AMOVA) 表明, 有 66.27% 的遗传变异来源于居群内, 居群间变异占总变异的 33.73%, 此结果与遗传分化系数 ( $G_{st} = 0.3568$ ) 结果吻合, 居群间基因流动 ( $N_m$ ) 为 0.902, 不同地区间硬叶兜兰居群存在较高的遗传分化; 7 个居群在遗传相似性系数 0.863 时聚为 2 支; 经 Mantel 检测 ( $r = 0.298, P > 0.05$ ), 表明居群间遗传距离与地理距离无显著相关性。居群当前较高的遗传分化与其交配系统有关; 其次, 外在因素: 人为采集、生境破坏和片断化造成居群内遗传多样性的丧失, 加剧居群间的遗传分化; 再次, 遗传漂变也是另一重要影响因素。此外, 适应性进化亦可能加剧了居群间的遗传分化, 而基因流动对遗传分化的影响不大。

**关键词:**硬叶兜兰; 遗传多样性; 遗传分化; SRAP 标记

## Genetic Structure of *Paphiopedilum micranthum* Populations from Core Distribution in Southeast Yunnan

LI Zong-yan<sup>1,2</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, ZENG Wan-biao<sup>2</sup>, LI Ming-yang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Horticulture and Landscape College, Southwest University, Chongqing 400715;

<sup>2</sup> Landscape and Architecture Faculty, Southwest Forestry University, Kunming 650224)

**Abstract:** *Paphiopedilum micranthum* is a rare and endangered orchid known as slipper orchid. Its survival had been so seriously threatened that it lead to a drastic decline in number and range of wild populations because of commercial need and habitation destruction. In order to assess the influence on genetic structure of *P. micranthum* and provide fundamental information for its protection, 167 samples from seven populations under the different disturb circumstance in the germplasm collection area-southeast yunnan limestone region were drawn to detect its genetic diversity and structure within and among populations by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) technology. Molecular marker revealed that it had a high level of genetic diversity at species level ( $PPB = 81.25\%$ ;  $I = 0.3709$ ) despite small population sizes, a quiet low level at population ( $PPB = 47.92\%$ ;  $I = 0.2348$ ), a moderate mean genetic distance among population ( $D = 0.1268$ ). Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that the contribution (66.27%) of variability came within population level and account for 33.73% of total variability, which was consist with the coefficient of genetic differentiation among populations ( $G_{st} = 0.3568$ ). *P. micranthum* maintained significantly higher population differentiation compared to other outcrossing orchid species ( $N_m = 0.902$ ). The 7 populations could be divided into two subgroups at genetic similarity coefficient of 0.863. There was no significant correlation among population genetic distance and geographical distance. The current studies suggested that mating system, selective collection, habitats destroyed, and fragmented lead to loss of genetic diversity within

收稿日期: 2012-06-21 修回日期: 2012-10-17 网络出版日期: 2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1737.022.html>

基金项目: 云南省自然科学基金 (2012ZC50097403); 国家林业局西南地区生物多样性保育实验室基金 (2010F02)

作者简介: 李宗艳, 博士研究生, 副教授, 研究方向为园林植物资源研究。E-mail: lizyan74@sina.com

通信作者: 李名扬, 教授, 研究方向为花卉生物技术。E-mail: limy@swu.edu.com

populations and aggravated gene differentiation. In addition, gene drift and adaptation evolution were very important reasons responsible for a high genetic differentiation. While genetic flow might be not the main factor for differentiation.

**Key words:** *Paphiopedilum micranthum*; genetic diversity; genetic differentiation; SRAP marker

兜兰属 (*Paphiopedilum*) 植物因花形奇特, 花姿优美具有较高的观赏价值, 被称为拖鞋兰, 所有种都被《濒危野生动植物物种国际贸易公约》(CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) 列为一级保护植物, 禁止贸易。硬叶兜兰 (*P. micranthum*) 分布于云南东南、贵州西南和北部、广西西部和越南北部, 生长于海拔 1000 ~ 1700 m 的石灰岩山坡草丛中或石壁积土处<sup>[1-2]</sup>。自 20 世纪 80 年代发现以来, 因商业贸易的需求, 种质资源大量被采挖, 造成了硬叶兜兰种群数量急剧下降和分布范围的缩小, 威胁到种群的生存。

近年来, 硬叶兜兰研究主要开展了植物地理学、传粉生物学、繁殖特性、居群遗传结构等。J. A. Fowlie<sup>[3]</sup> 和 Z. H. Tsi 等<sup>[4]</sup> 对国内硬叶兜兰的地理分布范围、种群大小等进行野外调查; 蜂类和食蚜蝇是硬叶兜兰的传粉者, 主要为黄熊蜂<sup>[5]</sup>; 自然状态下, 硬叶兜兰结实率和萌发率较低, 人工授粉后发育 120 d 的种子在 RE 培养基上萌发率最大, 可达 32.4%<sup>[6]</sup>; 李昂等<sup>[7]</sup> 运用空间自相关分析对硬叶兜兰小尺度范围的遗传变异的分布格局进行研究, 结果表明: 硬叶兜兰群体中遗传变异在空间上的分布呈斑块状, 遗传变异在短距离 (3 ~ 4 m) 内表现出显著的正相关, 在较大距离内表现出显著的负相关。

滇东南小区是云南向东南亚和云南向华南和华中过渡的交错汇合地带。滇东南的石灰岩地区极可能是兜兰的起源中心和演化中心, 兜兰在滇东南的石灰岩地区发生后, 向北回归线两侧的南亚热带地

区和南部热带地区扩散到贵州、广西、广东、海南和越南等中南半岛地区<sup>[8-9]</sup>。

作为采集压力最大的种, 尽管已颁布禁止贸易令, 但国内贸易仍在进行。滇东南红水河流域的溶岩地带是硬叶兜兰分布中心和主要采集区域。由于分布的石灰岩山区峰林岩陡, 取样调查较困难, 因此, 至今尚无相关人为采集对其遗传结构影响的研究报道。

群体遗传结构研究是探讨物种形成以及植物适应和进化机制的基础, 亦是制定有效保护策略和措施的依据<sup>[10]</sup>。相关序列扩增多态性 (SRAP, sequence-related amplified polymorphism) 已成功地应用到居群遗传变异和遗传结构分析<sup>[11-13]</sup>。本研究通过选取滇东南核心分布区的马关、文山和麻栗坡 3 个地区的 7 个不同人为干扰程度的居群, 利用 SRAP 技术进行居群遗传结构研究, 旨在对该区域当前硬叶兜兰居群的遗传多样性和遗传结构进行评估, 以期为其保护提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料采集和处理

选择云南省马关、文山和麻栗坡 3 个地区的不同采集压力区域的 7 个天然居群作为研究对象。由于人为采集和生境破坏的影响, 种群密度和大小有差异, 7 个居群共选取 167 个个体进行试验 (表 1)。随机抽样选取生长健壮的植株, 植株空间距离至少 2 m 以上, 将材料装入冰盒, 带回实验室 - 70 °C 保存。

表 1 硬叶兜兰 7 个居群采样地生境

Table 1 Habitation traits of samples collection sites of seven *P. micranthum* populations

采样点	编号	样本数	植被类型	居群受干扰程度	经度	纬度
Collection site	Code	No. of sample	Vegetation type	Degree of population disturbance	Longitude	Latitude
马关马固	MG	23	亚热带石灰岩灌丛	中度干扰	104. 17	23. 01
马关夹寒箐	JHQ	20	亚热带常绿落叶阔叶林	轻度干扰	104. 24	22. 53
马关古林箐	GLQ	30	亚热带常绿落叶阔叶林	轻度干扰	103. 58	22. 48
文山斗咀	DZ	25	亚热带常绿落叶阔叶林	天然种群	104. 23	23. 14
文山杨柳井	YLJ	19	亚热带石灰岩灌丛	中度干扰	104. 19	23. 11
文山小坝子	XBZ	19	亚热带石灰岩灌丛	轻度干扰	104. 20	23. 22
麻栗坡田坝	TB	31	亚热带石灰岩灌丛	天然种群	104. 47	23. 11

## 1.2 总 DNA 提取

硬叶兜兰叶片总 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法<sup>[14]</sup>,DNA 浓度经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将 DNA 样品稀释为 30 ng/ $\mu$ L, -20 °C 保存备用。

## 1.3 引物筛选、PCR 扩增和扩增产物检测

从每个居群中随机抽取 3 个样品进行 SRAP-PCR 引物筛选,引物序列来源于 G. Li 等<sup>[15]</sup>、M. Ferriol 等<sup>[16]</sup>和 Y. Zhang 等<sup>[17]</sup>设计开发的通用引物,共计 150 个组合,从中选取 10 对能稳定扩增、产生条带清晰丰富、多态性较好的引物组合(表 2)。

表 2 不同引物组合的扩增效果

Table 2 Amplified results of SRAP primer combinations

引物组合 Primer combination	总条带 Total bands	多态性条带 POL	多态性百分率 (%) PPB
me1/em4	30.0	20.0	66.67
me1/EM5	37.0	31.0	83.78
me2/em1	36.0	31.0	86.11
me3/Em9	33.0	32.0	96.97
me4/EM3	30.0	24.0	80.00
me4/em3	20.0	16.0	80.00
me5/em3	24.0	17.0	70.83
ME6/EM2	22.0	19.0	86.36
ME7/em1	34.0	26.0	76.47
ME7/EM2	22.0	18.0	81.81
平均 Mean	28.8	23.4	81.25
总体 Total	288	234	

PCR 扩增反应体系为:20  $\mu$ L 反应体系中含 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.3 mmol/L dNTP, 10  $\times$  PCR buffer, 0.5  $\mu$ mol/L primer, 1.6 U *Taq* DNA 聚合酶, 100 ng DNA 模板。扩增程序为:94 °C 预变性 5 min, 94 °C

变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 5 个循环;94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。

制备 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶,经 30 min 预电泳后,加样电泳( $U = 1500$  v,  $P = 75$  w) 1 h 30 min, 凝胶经固定、银染、显色和漂洗后拍照观察。

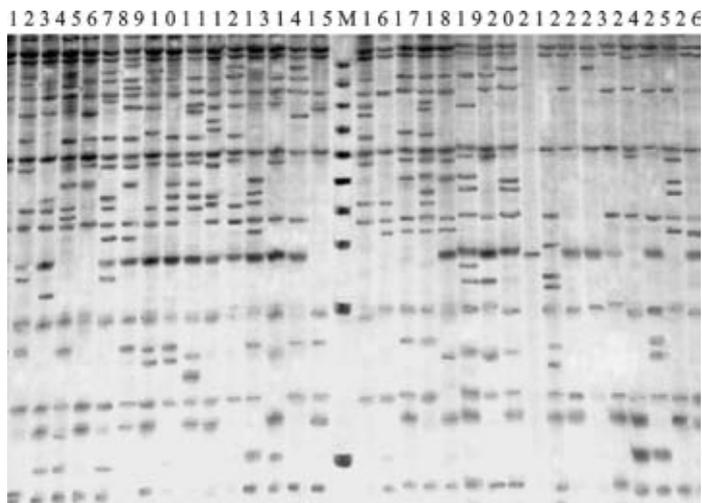
## 1.4 数据处理

依据电泳图谱中 ladder marker 标准分子量对扩增出的条带进行分子量编码,同一引物组合扩增的分子量相同的条带视为同一位点。电泳图谱中的每个样品的扩增带按有或无记录,有带赋值为 1,无带赋值为 0,得到原始数据矩阵,用 PopGen 32 软件计算观测等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、*Nei's* 基因多样性( $H$ )、Shannon's 指数( $I$ )、多态性位点比率(PPB)、遗传分化系数( $G_{st}$ )和基因流( $N_m$ );基于 *Nei's* 遗传距离用 NTSYS-pc 2.1 软件进行 UPGMA 方法进行居群亲缘关系构建;分子遗传变异的方差分析(AMOVA)和 Mantel 检测用 GenALEx 软件计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 硬叶兜兰居群的遗传多样性

从 150 对引物组合中筛选 10 对用来构建居群遗传变异数据,其中包括 7 个正向引物和 7 个反向引物。10 对引物共扩增出 288 个位点,其中多态性位点 234 个,多态性位点比率达 81.25%。扩增位点片断大小在 50 ~ 2300 bp 之间(图 1)。每对引物平均扩增产生 28.8 个位点,产生多态性位点比率最高的引物组合为 me3/Em9,达 96.97%(表 2)。



1 ~ 15: 古林箐样本; 16 ~ 26: 夹寒箐样本; M: 100 bp DNA Ladder Marker

1-15: GLQ population samples, 16-26: JHQ population samples, M: 100 bp DNA Ladder Marker

图 1 引物 ME7/em1 对古林箐居群和夹寒箐居群扩增结果

Fig. 1 Amplification result of population GLQ and JHQ by prime ME7/em1

7 个硬叶兜兰居群水平上多态性位点比率 (PPB) 有较大差异, YLJ 居群最高, 达 53.82%, MG 居群最低, 仅为 34.38%, 多态位点比率均值为 47.92%。观测的等位基因数在 1.5382 ~ 1.3438 之间, 有效等位基因数在 1.2915 ~ 1.1980 之间,  $Nei'$ s 基因多样性在物种水平上有 0.2422, 在居群水平上为 0.1550; 物种水平的 Shannon's 指数达 0.3709, 居

群水平仅为 0.2348。多项遗传参数结果都反映出 YLJ 居群遗传多样性最高 ( $Ne = 1.2915$ ;  $H = 0.1735$ ;  $I = 0.2632$ ), MG 居群较低 ( $Ne = 1.1980$ ;  $H = 0.1162$ ;  $I = 0.1752$ )。麻栗坡 TB 天然居群和马关 GLQ 轻度干扰居群遗传多样性亦较高。总的遗传多样性为 0.2411, 居群内的遗传多样性达 0.1550 (表 3)。

表 3 硬叶兜兰 7 个居群的遗传多样性指数

Table 3 Genetic diversity index of seven geographical populations of *P. micranthum*

居群 Population	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 $H$	Shannon's 指数 $I$	多态性位点百 分率 (%) PPB	总遗传多 样性 $H_T$	居群内遗传 多样性 $H_S$
马固 MG	1.3438(0.4758)	1.1980(0.3305)	0.1162(0.1803)	0.1752(0.2610)	34.38		
夹寒箐 JHQ	1.4618(0.4994)	1.2763(0.3655)	0.1606(0.1977)	0.2401(0.2839)	46.18		
古林箐 GLQ	1.5069(0.5008)	1.2874(0.3648)	0.1685(0.1962)	0.2537(0.2814)	50.69		
斗咀 DZ	1.5069(0.5008)	1.2392(0.3262)	0.1460(0.1814)	0.2253(0.2630)	50.69		
杨柳井 YLJ	1.5382(0.4994)	1.2915(0.3556)	0.1735(0.1927)	0.2632(0.2768)	53.82		
小坝子 XBZ	1.4688(0.4999)	1.2599(0.3454)	0.1550(0.1902)	0.2344(0.2754)	46.88		
田坝 TB	1.5278(0.5001)	1.2777(0.3520)	0.1655(0.1913)	0.2516(0.2751)	52.78		
居群 Populations	1.4792(0.4966)	1.2614(0.3486)	0.1550(0.1900)	0.2348(0.2738)	47.92		
物种 Species	1.8125(0.3910)	1.4026(0.3520)	0.2422(0.1823)	0.3709(0.2518)	81.25	0.2411(0.0330)	0.1550(0.0165)

括号中数字为标准差 The digital in the brackets represent deviation

$N_a$ : Observed number of alleles,  $N_e$ : Effective number of alleles,  $H$ :  $Nei$  gene diversity,  $I$ : Shannon's information index, PPB: The percentage of polymorphic loci,  $H_T$ : Total gene diversity,  $H_S$ : Gene diversity within populations

## 2.2 硬叶兜兰居群间遗传距离和亲缘关系

依据  $Nei'$ s 遗传距离, 7 个居群平均遗传距离为 0.1268。DZ 居群和 YLJ 居群间的遗传距离仅有 0.0659, 而 XBZ 居群和 MG 居群间有最大遗传距离, 为 0.1916。7 个居群遗传一致度最高的为 DZ 和 YLJ 居群, 达 0.9362, 其次是 MG 和 DZ 居群, 达 0.9355, XBZ 和 MG 居群间的遗传一致度最小, 仅为 0.8256 (表 4)。基于 UPGMA 聚类分析, 在相关系数达 0.863 时, 7 个居群聚为 2 分支, 第 1 分支由 MG、DZ 和 YLJ 居群组成, 第 2 分支由 GLQ、JHQ、XBZ

和 TB 居群组成 (图 2)。7 个居群的地理距离在 12 ~ 115 km, 而远距离居群 XBZ 与 TB 有着较近的亲缘关系, 近距离居群 DZ、XBZ 和 YLJ (12 ~ 22 km) 在亲缘关系聚类上分属不同的类群, 这一结果不符合群体遗传结构中的距离隔离模式。运用 Mantel 检验来检测居群间遗传距离与地理距离的相关性, 结果表明: 两者间的相关系数  $r = 0.298$  ( $P > 0.05$ )。当  $|r| < 0.3$  表示两者间关系极弱, 这一结果也证实了居群间遗传距离与地理距离无显著相关性。

表 4 硬叶兜兰 7 个居群的  $Nei'$ s 遗传一致度 (对角线上方) 和遗传距离 (对角线下方)

Table 4 The  $Nei'$ s genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among seven *P. micranthum* populations

居群 Population	马固 MG	夹寒箐 JHQ	古林箐 GLQ	斗咀 DZ	杨柳井 YLJ	小坝子 XBZ	田坝 TB
马固 MG	****	0.8578	0.8502	0.9355	0.8977	0.8256	0.8299
夹寒箐 JHQ	0.1534	****	0.9232	0.8704	0.9101	0.8844	0.8745
古林箐 GLQ	0.1623	0.0799	****	0.8641	0.9067	0.8960	0.8813
斗咀 DZ	0.0667	0.1388	0.1461	****	0.9362	0.8530	0.8484
杨柳井 YLJ	0.1079	0.0942	0.0979	0.0659	****	0.8797	0.8694
小坝子 XBZ	0.1916	0.1229	0.1098	0.1590	0.1282	****	0.9174
田坝 TB	0.1865	0.1341	0.1264	0.1645	0.1400	0.0862	****

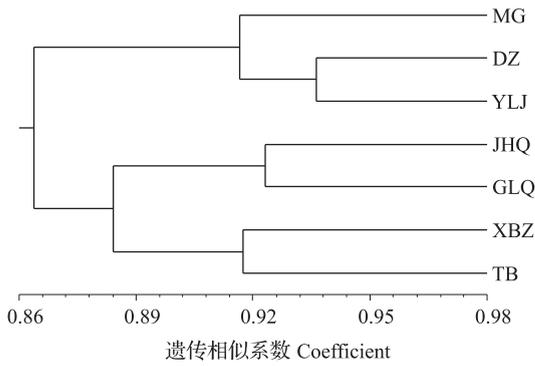


图 2 基于 UPGMA 聚类的居群间的亲缘关系

Fig. 2 Dendrogram generated using UPGMA analysis showing relationships among seven populations

### 2.3 不同等级水平的硬叶兜兰居群遗传结构

7 个居群的遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 达 0.3568, 据相关研究, 一般窄布种居群的遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 为

0.242<sup>[18]</sup>。这一结果揭示了检测居群间存在较高的遗传分化水平。而居群间平均基因流 ( $N_m$ ) 为 0.902。通过对 7 个居群的遗传变异成分分析, 结果表明: 有 66.27% 的遗传变异来源于居群内, 居群间遗传变异占总变异的 33.73% (表 5)。这一结果与遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 结果接近一致。

而同一地区和不同地区间居群的遗传分化的结果表明: 文山 3 个居群间的遗传变异达 32.19%, 而马关 3 个居群间的遗传变异占有 18.98%, 尽管马关居群与文山 DZ、YLJ 有着近缘关系, 马关地区居群间的遗传分化程度明显低于文山地区的总体水平; 地区间遗传变异的差异则反映出: 3 个地区中的任两地居群间遗传变异水平都超过总变异的 30% 以上, 地区间存在较高的遗传分化; 近缘居群 DZ、MG 和 YLJ 的遗传变异有不超过约 20% 的是来源于居群

表 5 基于 SRAP 的不同等级水平的硬叶兜兰居群的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) at different hierarchical level for 167 individuals based on SRAP

变异来源	自由度	平方和	均方差	变异组分	变异百分率 (%)	概率
Source	df	SS	MS	Estimate of variation	Percentage of variation	P
总居群间 Among all populations	6	2151.908	358.651	13.972	33.73	<0.001
总居群内 Within all populations	160	4392.332	27.452	27.452	66.27	<0.001
文山 3 个居群间 (Among XBZ, YLJ and, DZ)	2	617.572	308.786	13.474	32.19	<0.001
文山 3 个居群内 (Within XBZ, YLJ and, DZ)	60	1703.364	28.389	28.389	67.81	<0.001
马关 3 个居群间 (Among JHQ, GLQ and, MG)	2	47.000	23.500	0.832	18.98	<0.001
马关 3 个居群内 (Within JHQ, GLQ, and MG)	70	248.562	3.551	3.551	81.02	<0.001
马关与麻栗坡居群间 (Among MAGUAN and MALIPO)	3	1219.033	406.344	14.751	35.42	<0.001
两地居群内 (Within two regions)	100	2688.967	26.890	26.890	64.58	<0.001
文山与麻栗坡居群间 (Among WENSHAN and MALIPO)	3	1075.339	358.446	14.232	32.93	<0.001
两地居群内 (Within two regions)	90	2609.300	28.992	28.992	67.07	<0.001
马关与文山居群间 (Among MAGUAN and WENSHAN)	5	1620.663	324.133	13.196	32.98	<0.001
两地居群内 (Within two regions)	130	3486.396	26.818	26.818	67.02	<0.001
近缘居群间 (Among DZ, MG, and YLJ)	2	372.353	186.176	7.105	19.96	<0.001
近缘居群内 (Within DZ, MG, and YLJ)	64	1823.140	28.487	28.487	80.04	<0.001

间的。结合上述居群间的亲缘关系综合分析,马关 MG 居群在遗传特性上应介于文山 DZ 和 YLJ 和另 2 个马关居群间;7 个居群中,XBZ 和 TB 与其他居群存在较大的遗传分化。

### 3 讨论

一般而言,由于生境片断化和地理隔离影响了居群间的基因流动,易造成濒危物种居群间遗传多样性较低和高水平的遗传分化。特有种和窄布种居群间的遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 分别为 0.248 和 0.242,高于地区种和广布种的 0.216 和 0.210<sup>[18]</sup>。通常,窄布种尤其是珍稀濒危种类较广布种有着较低的遗传多样性。

对麻栗坡兜兰 (*P. malipoense*) 居群初步研究表明其在物种水平和居群水平遗传多样性都低,A. Li 等<sup>[19-20]</sup>对贵州 3 个和 1 个云南硬叶兜兰居群的初步研究表明,其在物种水平 ( $PPB = 71.6\%$ ,  $H = 0.2171$ ,  $I = 0.3301$ ) 和居群水平 ( $PPB = 45.1\%$ ,  $H = 0.1457$ ,  $I = 0.2204$ ) 的遗传多样性都高于麻栗坡兜兰,遗传变异组分有 20.31% 来源于居群间。当前,对滇东南核心采集区硬叶兜兰遗传结构研究的结果亦表明,虽然种质资源遭受不同程度的破坏,在物种水平上的遗传多样性仍还维持一定的水平 ( $PPB = 81.25\%$ ,  $H = 0.2422$ ,  $I = 0.3709$ ),总遗传多样性  $H_T$  为 0.2411,个体遗传多样性  $H_S$  达 0.1550,居群水平的遗传多样性略高于贵州居群,也充分证明该区域的多样性中心、起源中心的地位;但其在居群水平的遗传多样性也偏低 ( $PPB = 47.92\%$ ,  $H = 0.1550$ ,  $I = 0.2348$ ),且居群间的遗传分化更加显著, $G_{st}$  为 0.357,AMOVA 分析显示有高达 33.73% 的遗传变异来源于居群间。

物种的遗传变异水平和群体遗传结构是其繁育系统、物种生活史、基因流动、自然选择、遗传漂变和种子散布机制等不同因素综合作用的结果。交配系统的差异对居群遗传结构产生很大的影响,异交类群的遗传分化系数  $G_{st} = 0.23$ ,自交类群的  $G_{st} = 0.59$ <sup>[21]</sup>。硬叶兜兰属于高度异交种,靠食蚜蝇或黄熊蜂传粉,部分自交亲合,地理居群隔离的影响造成传粉者只能在近距离范围活动,因而造成居群内基因流动较频繁,而居群间基因流动不高,是导致遗传分化系数较高的内在原因之一;而其自然状态下结实率较低,加之人为花期大量采集,严重制约了其天然更新,因而,该物种主要靠无性繁殖维持居群大小,造成居群内的遗传变异水平下降,这可能是导致

扩大居群间遗传分化程度的另一重要原因;再次,硬叶兜兰特殊的生活史,需要与真菌共生才能萌发,加之其只能在潮湿的、枯枝落叶层丰富的灌丛阴坡或遮荫度好的常绿阔叶林下生长,植物严格选择定居生境,而人为活动如樵砍、破坏栖息生境,影响居群分布范围。结合野外生境调查的情况,在常绿落叶阔叶林内硬叶兜兰天然居群垂直分布范围在上下 20 m 以内波动,人为干扰居群的分布范围则更小,造成居群个体数量较少,导致遗传漂变,而研究对象的遗传距离与地理距离之间缺乏显著相关性则证明了遗传漂变在居群间的分化中起着不可忽视的作用,7 个硬叶兜兰居群相互隔离,遗传漂变可能是影响居群遗传结构和加剧居群间遗传变异的又一重要因素;此外,居群遗传分化还来源于适应性进化,硬叶兜兰分布的生境较复杂,可以在次生石灰岩灌丛和常绿落叶阔叶林下树脚、石缝和岩石面上的枯枝落叶风积土上生长。而研究结果表明,马关居群间的遗传分化与近缘居群间遗传分化接近,而其生境特点较相似,据此结果推测极有可能在不同的生境条件下,经过长期自然选择,对异质生境产生局部适应,导致硬叶兜兰个体在进化过程中固定一些特殊的适应性基因,加剧不同生境下居群间遗传分化水平,当然,这一推论还有待进一步的研究证实;居群间保持高水平、稳定的基因流动可以防止居群间的遗传分化,而研究的 7 个居群间平均基因流动 ( $Nm = 0.902$ ) 接近 1,可以推断基因流动应当不是造成居群间的遗传分化大的主要原因。基于遗传多样性指数、遗传分化和聚类研究结果,初步推断马关地区应为该区域硬叶兜兰的核心种质区和起源地区。

研究鉴于主要分布区当前居群间遗传分化显著的事实,居群原地保护措施应重视保护地范畴,应采取尽可能多地扩大居群保护范围,对遗传分化大的居群采取重点保护,划定一定的保护区;针对遗传多样性主要存在居群内的这一特点,加强居群内的个体的保护,加强民众科普宣传,减少采集,尤其是在过渡采集区内禁止采集;尽管硬叶兜兰有较强的无性克隆能力,但维持其遗传变异主要是来源于有性杂交,而较低的自然结实率和其特殊生活史导致其有性繁殖的成功率不高,花期采集加剧了有性繁殖困难,在原地保护计划中,为了减少居群遗传多样性的下降,对居群自然恢复最有效的措施就是禁止花期采集活动;重视生境保护,基于硬叶兜兰对生境的严格选择性,应选择有适度遮荫度、枯枝落叶层和苔

藓植物丰富等的个体适宜的定居环境,加强自然分布区生境保护,禁止过度伐树和收集腐质土;迁地保护措施主要是重点收集遗传分化大的居群数量,居群内样本尽可能多的取样,人工栽培环境要有适度的遮荫、通风,注意夏秋季保湿,提高栽培成活率。

#### 参考文献

- [1] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社, 2000:123-124
- [2] Cribb P, Luo Y B, Siu G. *Paphiopedilum micranthum* in North-east Guizhou, a significant range extension [J]. *Orchid Rev*, 2002, 1243:40-43
- [3] Fowlie J A. China; awash in the Bitter Sea, Part. III. *Paphiopedilum micranthum* among limestone on the southeast border of Guizhou Plateau [J]. *Orchid Digest*, 1989b, 53:132-139
- [4] Tsi Z H, Luo Y B, Cribb P, et al. A preliminary report on the population size, ecology and conservation status of some *Paphiopedilum* species (*Orchidaceae*) in South-west China [J]. *Lindleyana*, 1999, 14:12-23
- [5] Banziger H. Studies on the natural pollination of three species of wild lady-slipper orchids (*Paphiopedilum*) in Southeast Asia [M]//Pridgeon A. Proceedings of the 14th world orchid conference. Edinburgh; HMSO, 1994:201-202
- [6] 曾宋君,陈之林,吴坤林,等. 兜兰无菌播种和组织培养研究进展[J]. *园艺学报*, 2007, 34(3):793-796
- [7] 李昂,罗毅波,葛颂. 采用空间自相关分析研究两种兰科植物的群体遗传结构[J]. *生物多样性*, 2002, 10(3):249-257
- [8] 吴征镒. 中国植被[M]. 北京:科学出版社, 1980:26
- [9] 陈心启,吉占和. 麻栗坡兜兰——兜兰属与杓兰属的一个中间类型(兼论兜兰属的地理起源问题) [J]. *植物分类学报*, 1984, 22(2):119-124
- [10] Hamrick J L, Godt M J K. Conservation genetics of endemic plant species [M]//Avice J C, Hamrick J L. Conservation genetics; case histories from nature. New York: Chapman and Hall, 1996: 281-304
- [11] Feng N, Xue Q, Guo Q, et al. Genetic diversity and population structure of *Celosia argentea* and related species revealed by SRAP [J]. *Biochem Genet*, 2009, 47:521-532
- [12] 曾兵,左福元,张新全,等. 鸭茅种质资源遗传多样性的 SRAP 研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(5):709-715
- [13] 张鲜艳,陈发棣,张飞,等. 不同地理居群野生菊资源的遗传多样性分析[J]. *南京农业大学学报*, 2011, 34(1):29-34
- [14] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull Botani Soc Am*, 1987, 19:11-15
- [15] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103:455-461
- [16] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP marker [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(2):271-282
- [17] Zhang Y, Chen B, Zhao H, et al. Genetic comparability analysis of seven accessions of *Brassica oleracea* var. *Acephala* [J]. *Mol Plant Breeding*, 2008 6(2):309-315
- [18] Hamrick J L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations [M]. New York:Academes Press, 1987:87-103
- [19] Li A, Ge S. Genetic variation and conservation of *Changnienia amoena*, an endangered orchid endemic to China [J]. *Plant Syst Evol*, 2006, 258:251-260
- [20] Li A, Luo Y B, Xiong Z T, et al. A preliminary study on conservation genetics of three endangered orchid species [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(2):250-252
- [21] Hiddle N, Lgor V B. Effectiveness of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspect Plant Ecol*, 2000, 3(2):93-111