

• 研究简报 •

准噶尔无叶豆片断化居群的遗传变异及克隆多样性

陆雪莹^{1,2} 张道远^{1*} 马文宝³

1 (中国科学院新疆生态与地理研究所吐鲁番沙漠植物园, 乌鲁木齐 830011)

2 (中国科学院研究生院, 北京 100049)

3 (新疆农业大学, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 准噶尔无叶豆(*Eremosparton songoricum*)是豆科无叶豆属小半灌木,既能开花结实进行有性繁殖,又可以靠根茎进行无性克隆繁殖,为国家三级保护植物,在中国仅片断化分布于新疆古尔班通古特沙漠局部区域。本文采用ISSR分子标记对采自古尔班通古特沙漠腹地及边缘的7个准噶尔无叶豆自然居群共148个个体进行了遗传变异和克隆多样性分析。8个引物共扩增出84个位点,其中77个为多态性位点,物种水平上的多态位点百分比PPB为91.67%, Nei's基因多样性指数 I 为0.3192, Shannon信息指数 H 为0.3540;居群水平上的多态位点百分比PPB为58.45%, Nei's基因多样性指数 I 为0.2248, Shannon信息指数 H 为0.3270。居群间的遗传分化系数 G_{ST} 为0.2978。AMOVA分析表明,有31.88%的遗传变异存在于居群间,表明居群间存在显著的遗传分化。克隆多样性分析表明,居群水平上,居群G的Simpson多样性指数和均匀度指数最高,分别为0.9400和0.9885;居群E最低,分别为0.8457和0.9021。物种水平上, Simpson多样性指数为0.9858, 均匀度指数为0.9673。本研究结果表明,和其他荒漠植物相比,准噶尔无叶豆表现出较高的遗传变异水平和克隆多样性,这主要与该物种兼性生殖的繁育方式及多克隆起源有关;而居群间产生了显著的遗传分化则主要由于人为干扰引起的生境片断化和居群减小而导致的基因交流障碍所致。遗传变异水平和遗传结构的研究将为分析准噶尔无叶豆致濒原因及进化潜力提供重要资料,对该物种保护具有指导意义。

关键词: *Eremosparton songoricum*, 生境片断化, ISSR, 遗传变异, 克隆多样性, 保育遗传学

Genetic variation and clonal diversity in fragmented populations of the desert plant *Eremosparton songoricum* based on ISSR markers

Xueying Lu^{1,2}, Daoyuan Zhang^{1*}, Wenbao Ma³

1 Turpan Eremophytes Botanical Garden, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011

2 Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

3 Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052

Abstract: *Eremosparton songoricum* is a clonal shrub that reproduces both asexually by below-ground rhizomes and sexually by seeds. Having been severely disturbed by human activities, it has greatly declined in range, population number and population size over the past decades. It is now a rare species with a narrow distribution in fragmented habitat patches in the Gurbantuggut Desert of Xinjiang, China. Inter-Simple sequence repeats (ISSR) were used to evaluate the genetic variation and clonal diversity of seven populations (148 individuals) of *E. songoricum* from Gurbantuggut Desert. A total of 84 discernible bands were generated using eight primers of which 77 were polymorphic, indicating considerable genetic variation at the species level (PPB=91.67%, I =0.3192) and at population level (PPB=58.45%, I =0.2248) compared to other desert plants. A relatively high value of G_{ST} (0.2978) indicated significant genetic differentiation among popu-

收稿日期: 2007-01-04; 接受日期: 2007-03-14

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX3-SW-343)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: daoyuanzhang@163.net

lations. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that 31.88% of the ISSR variation resided among populations. Barriers of gene flow caused by habitat fragmentation and population size reduction may contribute to the significant genetic differentiation among populations. Simpson diversity index (D) ranged from 0.8457–0.9400 at population level, indicating that clonal diversity was also high. The evenness of distribution of genotypes in the seven populations was 0.9673 at species level, with all of the genotypes being local ones. The high level of genetic variation and clonal diversity found in *E. songoricum* are probably due to outcrossing or mixed-mating breeding system and multi-clone origin of populations. The results provide baseline data for formulating conservation strategies for this species. Conservation strategies should include both *in situ* and *ex situ* approaches to preserve the greatest possible extent of the genetic diversity of the species.

Key words: *Eremosparton songoricum*, habitat fragmentation, ISSR, genetic variation, clonal diversity, conservation genetics

生境片断化和栖息地丧失是导致野生居群灭绝的最直接因素, 因此对片断化居群的保育遗传学研究逐渐受到保护生物学家的广泛关注(Young *et al.*, 1996; Primack, 1993; Frankham *et al.*, 2002)。生境片断化使原本连续的大居群变成多个孤立的小居群, 这一过程将对物种的遗传学特性产生一系列不良影响。许多研究表明生境片断化阻断了居群间的基因流, 增加了居群的近交率, 进而加剧居群的近交衰退和遗传漂变, 最终导致居群的遗传多样性丧失和居群间遗传分化的增大(Buza *et al.*, 2002; Shea & Fournier, 2002; Tomimatsu & Ohara, 2002); 但也有研究表明片断化居群也可以具有较高的遗传多样性水平和居群间较低的遗传分化(Chung, 1999; Kahmen & Poschlod, 2000; Vasseur, 2001)。总之, 对生境片断化对植物居群影响的遗传后果尚缺乏足够的了解, 有必要进行深入研究, 尤其对于稀有濒危物种片断化居群遗传结构及遗传分化的研究, 有助于了解稀有濒危物种受威胁的原因和现状, 为制定合理保育策略提供重要依据。

ISSR(inter-simple sequence repeat)标记是在PCR技术基础上发展起来的一种检测方法(Zietkiewicz *et al.*, 1994), 其原理和RAPD相同, 但具有比RAPD更高的可重复性和稳定性(Tsumura *et al.*, 1996; Fang & Roose, 1997)。近年来, ISSR分子标记已被广泛应用于植物的遗传多样性研究(钱韦等, 2000; 葛永奇等, 2003; Panda *et al.*, 2003; 冷欣等, 2005)。ISSR分子标记技术在克隆植物的遗传变异研究中的应用, 使得深入探究克隆植物遗传变异产生和维持的机制、有性繁殖与无性繁殖的适应意义以及克隆繁殖方式对珍稀濒危物种的影响等研究

成为可能(Li & Ge., 2001; Ge *et al.*, 2003)。

准噶尔无叶豆(*Eremosparton songoricum*)系豆科无叶豆属小半灌木, 是中亚荒漠特有种, 同时也是稀有种(尹林克等, 2006), 分布区和生态幅狭窄。据《苏联植物志》记载, 该物种主要分布在巴尔喀什附近(Васильченко, 1941), 在中国仅片断化分布于新疆古尔班通古特沙漠局部区域(陈昌笃等, 1983; 刘嫫心, 1987; 张立运和海鹰, 2002), 为国家三级保护植物。准噶尔无叶豆多分布在流动或半固定沙丘的迎风坡中下部和风蚀谷地的侧坡地段, 是典型的兼性克隆植物, 既能开花结实进行有性繁殖, 又能通过水平根茎进行无性克隆繁殖。2004–2006年的调查中发现, 该种虽可正常结实, 但结实率较低, 仅为12–16%。即使在正常结实的果实中, 每果也仅产生1–2粒种子, 其余8余枚的胚珠均败育。此外, 呈组织发育不全的“水泡”状或呈极度萎蔫缩小的“干瘪”状种子达 $16.2 \pm 2.31\%$, 被虫蛀的种子比例达 $16.92 \pm 2.69\%$ ^①。然而该种无性克隆能力很强, 2年生植株单条水平根茎可延伸到5 m以外, 克隆分株可达20个之多, 说明克隆生长与克隆整合特性对准噶尔无叶豆在水分短缺、营养贫乏、生境破碎以及经常遭受扰动的沙地生境中的生存有重要贡献。

近半个世纪以来, 准噶尔无叶豆群落受到人为活动的强烈影响。由于大面积的农垦开荒, 20世纪80年代在沙漠北端分布的部分居群, 在近两年的调查中已变成了规整的农田区; 在沙漠腹地, 由于油

① 马文宝(2007)准噶尔无叶豆的繁殖生态学特性研究. 中国科学院新疆生态与地理研究所硕士学位论文

田开采、引水工程、筑路、修渠等工程的影响,准噶尔无叶豆种群片断化分布的趋势更加明显。在2004–2006年调查期间,发现该种居群常相隔数公里至几十公里,且以面积小于 300×300 m的居群为多,该物种濒危的状况在日益加剧。因此,有必要加大对该物种的研究力度,从物种繁育特性、克隆种群动态、生活史策略、遗传分化特征等方面开展研究,并积极开展有效保护。本文是上述系列研究中的一部分,重点是利用ISSR分子标记对准噶尔无叶豆片断化居群的遗传变异及克隆多样性进行研究,旨在了解:(1)遗传变异水平及成因;(2)生境片断化对居群遗传分化的影响;(3)克隆多样性水平。目的是探查生境片断化及克隆繁殖方式对准噶尔无叶豆的遗传后果及作用机制,同时为制定适宜的保育策略提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

取样地点位于新疆古尔班通古特沙漠。2005年

5–8月在沙漠腹地及边缘县市的流动沙丘上选择7个居群分单株进行取样。其中A, B, C, D, E 5个居群位于沙漠腹地, F, G居群分别位于沙漠边缘的奇台县芨芨湖乡和阿勒泰福海县的喀拉布勒根乡(图1)。为避免对同一克隆植株的重复取样,取样时按照同一方向,单株的间隔距离至少为2 m,每个居群的取样个体数均在20株以上。采集幼嫩营养枝迅速用硅胶干燥后带回实验室保存。详细记录7个取样地点的地理分布和每个地点的取样单株数(表1)。

1.2 基因组DNA的提取与PCR扩增

采用改良的2×CTAB法(张娟等, 2001)提取基因组DNA。ISSR扩增反应条件经过比较和优化确定为20 μ L PCR反应体系: $1 \times Taq$ buffer, 2 mmol/L Mg^{2+} , 0.5 μ mol/L引物, 0.25 mmol/L dNTPs, 0.5 U Taq DNA 聚合酶(上海生工生物工程公司)以及10–30ng的模板DNA。PCR扩增程序为: $94^{\circ}C$ 预变性4 min后进入循环; $94^{\circ}C$ 变性45 s, $53.5^{\circ}C$ 复性45 s, $72^{\circ}C$ 延伸45 s, 40个循环后 $72^{\circ}C$ 延伸7 min。PCR扩增在Bio-Rad公司的定量PCR仪上进行。PCR产物在

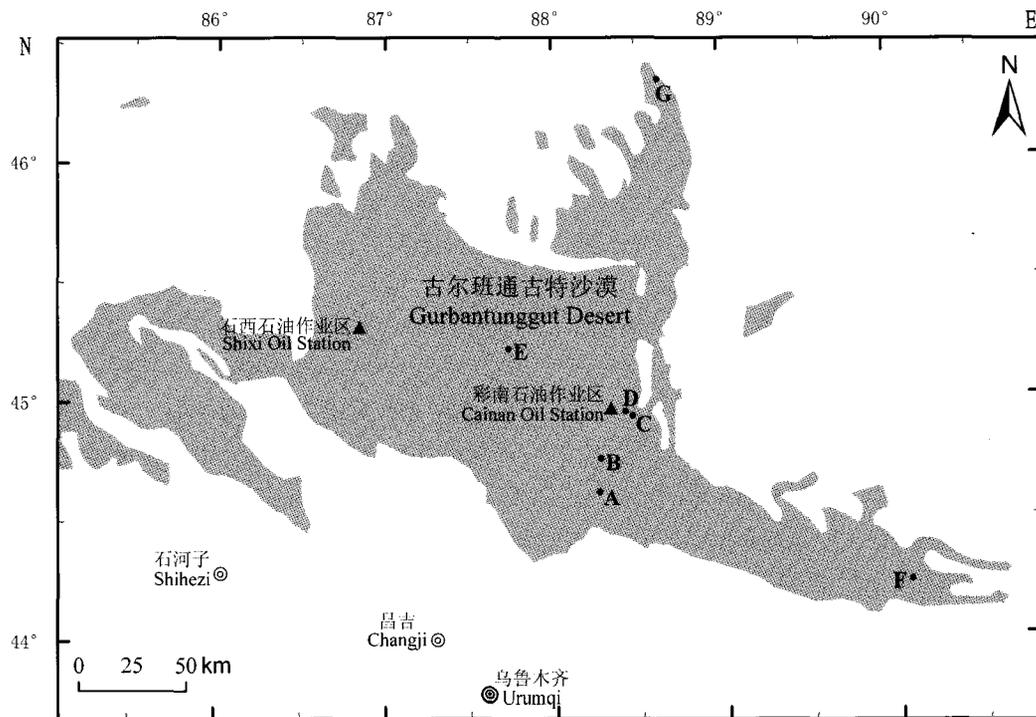


图1 准噶尔无叶豆在古尔班通古特沙漠(灰色区域表示古尔班通古特沙漠主体)的采样点示意图,其中两个三角代表石西及彩南石油作业区

Fig. 1 The sampling sites of *Eremosparton songoricum* in Gurbantunggut Desert, Xinjiang. The gray area is the main part of Gurbantunggut Desert, the triangles are Shixi and Cainan oil stations.

表1 古尔班通古特沙漠准噶尔无叶豆居群采样位置及生境

Table 1 Sample size, altitude, location and habitats of seven *Eremosparton songoricum* populations from Gurbantunggut Desert, Xinjiang

居群编号 Population	采集株数 Sample size	经纬度 Location	海拔 (m) Altitude	群落类型 Community type	生境 Habitat
A	21	44°38'N 88°16'E	548	准噶尔无叶豆 + 蛇麻黄群落 <i>Eremosparton songoricum</i> + <i>Ephedra distachya</i> commu- nity	南北向沙垄下部风蚀流沙地 Wind erosion sand surface of the lower south-north dune
B	25	44°46'N 88°16'E	605	准噶尔无叶豆 + 沙蒿 + 三 芒草群落 <i>Eremosparton songoricum</i> + <i>Artemisia arenaria</i> + <i>Aristida</i> <i>pennata</i> community	垄间低地及沙丘中下部 Interdune and middle-lower part of the dune
C	20	44°57'N 88°27'E	621	准噶尔无叶豆 + 三芒草 + 一年生植物群落 <i>Eremosparton songoricum</i> + <i>Aristida pennata</i> + annual plant community	垄底部至缓起伏的垄顶 From the bottom to the top of dune
D	20	44°58'N 88°25'E	647	准噶尔无叶豆纯群 <i>Eremosparton songoricum</i> community	道路和引水工程等建设区周围或两 侧的缓起伏沙垄(沙丘)上 On dunes beside the road or encircle the transferring water project
E	21	45°14'N 87°44'E	627	准噶尔无叶豆纯群 <i>Eremosparton songoricum</i> community	道路和引水工程等建设区周围或两 侧的缓起伏沙垄(沙丘)上 On dunes beside the road or encircle the transferring water project
F	20	44°14'N 90°04'E	718	准噶尔无叶豆 + 三芒草 + 一年生营养期植物群落 <i>Eremosparton songoricum</i> + <i>Aristida pennata</i> + annual plant community	垄底部至缓起伏的垄顶 From the bottom to the top of dune
G	21	46°21'N 88°38'E	794	准噶尔无叶豆 + 沙蒿群落 <i>Eremosparton songoricum</i> + <i>Artemisia arenaria</i> community	南北向“U”型沙垄之间 “U” type of intredune of the south-north dune

1.0%(w/v)的琼脂糖凝胶上电泳,以2,000 bp Marker(宝生物工程(大连)有限公司)作为标准分子量对照,在含有0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的EB中显色20–30 min,在Gene Genius (Syngene Co., UK)凝胶分析仪上观察并照相。

1.3 引物筛选

实验所用ISSR引物均由上海生工生物工程公司合成,引物序列参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第9套ISSR引物序列(http://www.michael-smith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primer.pdf)。每个居群内任选2个样品作为模板,在20 μL 反应体系中进行扩增筛选,从30多条引物中选出8条扩增条带较多、重复性好、背景清晰的引物用于全部7个居群DNA样品的扩增(表2)。

1.4 统计分析

电泳图谱中的每一条带均视为一个分子标记(marker),并代表一个引物的结合位点。以2,000 bp Marker作为相对分子量标准,由同一引物扩增的电

泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,按照相同迁移位置上DNA带的有无进行统计,有带(包括弱带)的记为“1”,无带的记为“0”,建立0/1数据矩阵。在某一特定位点上,扩增的DNA片段出现的频率小于0.99的位点即为多态位点。得到的ISSR数据矩阵分别用于以下分析。

1.4.1 遗传多样性分析

采用POPGENE 1.31(Yeh *et al.*, 1999)软件在假定种群处于Hardy-Weinberg平衡状态下,对全部居群与各单个居群分别进行遗传参数分析,分别计算了多态位点百分率(PPB)、Nei's基因多样性指数(I)(Nei, 1973)、Shannon信息多样性指数(H)(Lewontin, 1972)、总的基因多样性(H_T)、居群内的基因多样性(H_S)、基因分化系数(G_{ST})、基因流(N_m)、Nei's遗传距离和遗传一致度。用DCFA1.1(张富民和葛颂, 2002)软件进行AMOVA分析,基于样品间的欧氏距离平方(Stewart & Excoffier, 1996)计算遗传变异在居群间和居群内的分布。用NTSYS-pc 2.0

表2 各引物序列、扩增谱带与多态性谱带数

Table 2 Primer sequences, number of bands and number of polymorphic bands

引物编号 Primer	序列(5'-3') Sequence	统计谱带数 No. of bands scored	多态性谱带数 No. of polymorphic bands
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	11	10
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	10	10
UBC825	ACACACACACACACT	11	11
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGA(CT)T	11	11
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGA(CT)G	9	8
UBC855	ACACACACACACAC(GC)T	13	13
UBC859	TGTGTGTGTGTGTG(AT)C	10	9
UBC888	(CGT)(ACT)(CGT)CACACACACACA	9	5

(Rohlf, 1998)中的SHAN和TREE程序对POPGENE得到的遗传距离矩阵进行UPGMA聚类分析, 建立聚类分支图。

1.4.2 克隆多样性检测

克隆多样性检测用以下指数(Fager, 1972; Ellstrand & Roose, 1987): (1)每个居群的实际基株数目(或基因型数目) G ; (2)平均克隆尺度(mean clone size) $N_c = N / G$, N 为样品个体数; (3)基因型比率(proportion distinguishable) $PD = G/N$; (4) Simpson指数 $D = 1 - [N_i(N_i - 1) / N(N - 1)]$, N_i 为样本内第*i*种基因型的总数; (5)居群内基因型分布的均匀度 $E = (D - D_{\min}) / (D_{\max} - D_{\min})$, 其中 $D_{\min} = (G - 1)(2N - G) / N(N - 1)$, $D_{\max} = (G - 1)N / G(N - 1)$ 。

2 结果

2.1 居群和物种水平的ISSR多态性

8条引物对7个准噶尔无叶豆自然居群共148个个体进行了ISSR扩增(表3)。物种水平上, 共检测到84个可分析条带, 其中多态条带77个, 占91.67%, Nei's基因多样性指数(I)为0.3192, Shannon信息多样性指数(H)为0.4767; 居群水平上, 多态位点百分率在53.95-69.23%之间, 最低的是沙漠腹地B居群, 最高的是沙漠腹地的A居群。Nei's基因多样性指数在0.1912-0.2670之间, Shannon信息多样性指数在0.2809-0.3854之间, 其大小变化趋势与居群多态位点百分率基本一致。

2.2 居群的遗传分化程度及基因流

POPGENE分析结果表明, 7个居群总的基因多样性(H_T)为0.3202, 其中居群内的基因多样性(H_S)为0.2248, 居群间基因分化系数(G_{ST})为29.78%, 基

因流(N_m)为1.1788。AMOVA分析结果表明居群间遗传变异所占比率(F_{ST})为31.88% ($P < 0.341$) (表4), 与POPGENE软件分析的基因分化系数(G_{ST})结果接近, 获得了基本一致的居群变异趋势, 说明准噶尔无叶豆自然居群间已出现一定程度的遗传分化。

2.3 居群间遗传距离及聚类分析

表5反映了不同居群间的遗传距离和遗传一致度, 可见沙漠腹地的D和E居群之间的遗传距离最小, 为0.1140; 距离最大的是沙漠腹地的A居群和沙漠边缘的F居群, 为0.2116。

用NTSYS-pc2.0中的SHAN和TREE程序对POPGENE得到的居群间遗传距离矩阵进行UPGMA聚类分析(图2)。7个居群大致可分为3个分支: 第1分支包括沙漠腹地的D、E 2个居群; 第2分支包括沙漠腹地B、C和沙漠边缘的F、G居群; 沙漠腹地的A居群单独成第3分支。另外, 对148个个体进行UPGMA聚类(数据未列出), 结果表明大部分个体按居群各自聚在一起, 进一步表明居群间产生了一定程度的遗传分化。

2.4 克隆多样性

准噶尔无叶豆的克隆多样性和分布均匀度的度量结果见表6。结果显示所有居群均为多克隆居群, 基因型数目最多的是G居群, 21个样本中检测到19种基因型; 最少的为B居群, 25个样本中仅检测到11种基因型。B居群的平均克隆尺度较高, 为2.2727, 基因型比率最低, 为0.4400; G居群的平均克隆尺度最低, 为1.1053, 基因型比率最大, 为0.9048。此外, G居群的基因型多样性(Simpson多样性指数)较高, 达到0.9400; 而E居群则最低, 为0.8457。从基因型分布的均匀度来看, 沙漠边缘F、G

表3 准噶尔无叶豆7个居群的遗传多样性测度(居群代号同表1)

Table 3 Percentage of polymorphic bands (PPL) and Shannon index (I) for seven *Eremosparton songoricum* populations. Population codes see Table 1.

居群编号 Population	采集株数 Sample size	扩增位点数 No. of bands	多态位点数 No. of polymorphic bands	多态位点百分比 PPL	Nei's基因多样性指数 H	Shannon多样性指数 I
A	21	78	54	69.23	0.2670 ± 0.2176	0.3854 ± 0.3070
B	25	76	41	53.95	0.1912 ± 0.2081	0.2809 ± 0.3001
C	20	81	50	61.73	0.2476 ± 0.2227	0.3569 ± 0.3136
D	20	81	44	54.32	0.2027 ± 0.2109	0.2978 ± 0.3010
E	21	83	45	54.22	0.2176 ± 0.2136	0.3174 ± 0.3058
F	20	83	46	55.42	0.2193 ± 0.2167	0.3193 ± 0.3079
G	21	78	47	60.26	0.2285 ± 0.2194	0.3313 ± 0.3109
居群水平 Population level	—	80	46.71	58.45	0.2248 ± 0.2156	0.3270 ± 0.3066
物种水平 Species level	148	84	77	91.67	0.3192 ± 0.1668	0.4767 ± 0.2194

表4 准噶尔无叶豆7个居群AMOVA分析

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) analysis for seven populations of *Eremosparton songoricum*

变异来源 Source of variance	自由度 d.f.	方差和 Sum of squares	均方 Mean squares	变异组分 Variance component	变异百分率(%) Percent of variance component	显著性检验 P
居群间 Among populations	6	515.679	85.946	3.695	31.88	<0.341
居群内 Within population	141	1113.261	7.895	7.896	68.12	<0.001

表5 Nei's遗传一致度(I)(右上角)和遗传距离(D)(左下角)(居群代号同表1)

Table 5 Nei's genetic identity (I, above diagonal) and genetic distance (D, below diagonal). Population codes see Table 1.

	A	B	C	D	E	F	G
A	—	0.8337	0.8607	0.8199	0.8221	0.8093	0.8175
B	0.1819	—	0.8653	0.8826	0.8585	0.8832	0.8654
C	0.1500	0.1446	—	0.8697	0.8541	0.8655	0.8619
D	0.1985	0.1249	0.1396	—	0.8922	0.8732	0.8551
E	0.1959	0.1525	0.1577	0.1140	—	0.8564	0.8570
F	0.2116	0.1243	0.1444	0.1355	0.1550	—	0.8813
G	0.2015	0.1446	0.1487	0.1565	0.1543	0.1264	—

居群的均匀度最高,分别为0.9764和0.9885;而沙漠腹地E居群的均匀度相对较低,为0.9021。另外根据Ellstrand和Roose(1987)对基因型在居群中分布的标准,得出局部基因型(仅出现在一个居群中的基因型)百分率(GL)为93.92%,没有广布基因型(出现在75%以上的居群中的基因型)。可见不同居群间克隆差异较大。

3 讨论

3.1 准噶尔无叶豆的遗传变异和克隆多样性

很多研究表明,克隆植物具有与有性生殖植物相当的遗传变异水平(Ellstrand & Roose, 1987; Hamrick & Holden, 1979; Widén *et al.*, 1994)。本研究发现,准噶尔无叶豆在物种水平上的遗传变异水平为PPB = 91.67%, H = 0.4767, 稍高于其他荒漠植物的ISSR遗传多样性,如白梭梭(*Haloxylon persicum*): PPB = 84.85%, H = 0.3518(张萍等, 2005); 四合木(*Tetraena mongolica*): PPB = 63.3%, H = 0.324(Ge *et al.*, 2003); 梭梭(*Haloxylon ammodendron*): PPB = 89.7%, H = 0.328 (Sheng *et al.*, 2004),

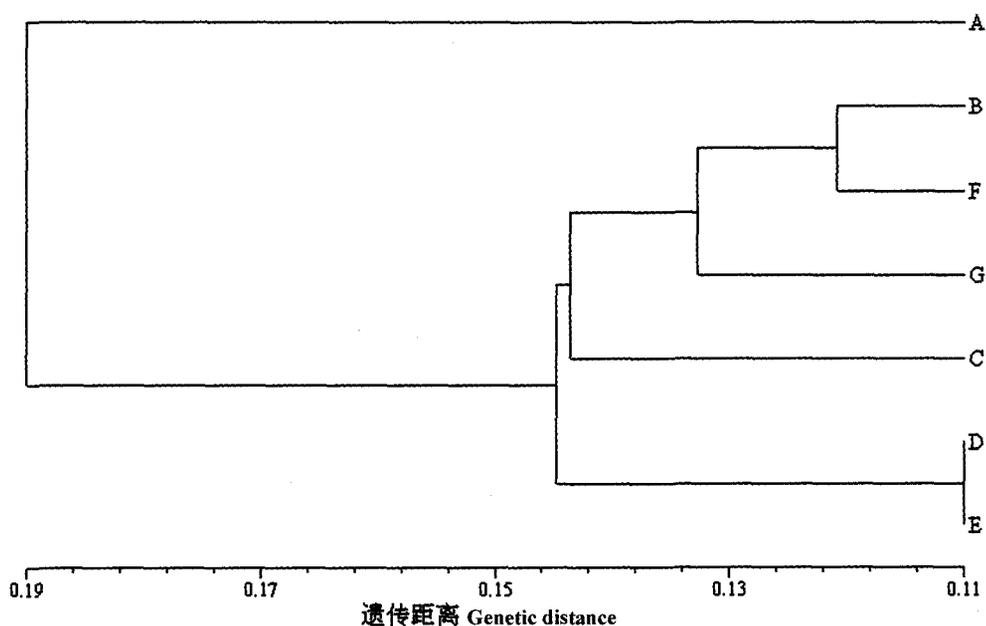


图2 准噶尔无叶豆7个居群的UPGMA聚类图(居群代号同表1)

Fig. 2 UPGMA dendrogram of the seven populations of *Eremosparton songoricum*. Population codes see Table 1.

表6 准噶尔无叶豆7个居群的克隆多样性测度(居群代号同表1)

Table 6 Clonal diversity and distribution uniformity in the seven populations of *Eremosparton songoricum*. Population codes see Table 1.

居群编号 Population	样本数 <i>N</i>	基因型数目 <i>G</i>	平均克隆尺度 $N_c(=N/G)$	基因型比率 $PD(=1/N_c)$	Simpson多样性指数 <i>D</i>	均匀度指数 <i>E</i>
A	21	15	1.4000	0.7143	0.9100	0.9577
B	25	11	2.2727	0.4400	0.8719	0.9440
C	20	12	1.6667	0.6000	0.8889	0.9563
D	20	13	1.5385	0.6500	0.8978	0.9642
E	21	11	1.9091	0.5238	0.8457	0.9021
F	20	17	1.1765	0.8500	0.9259	0.9764
G	21	19	1.1053	0.9048	0.9400	0.9885
居群水平 Population level	—	14	1.5813	0.6690	0.8972	0.9556
物种水平 Species level	148	95	1.5102	0.6622	0.9858	0.9673

也远远高于其他荒漠克隆植物的等位酶遗传多样性, 如沙鞭(*Psammochloa villosa*): $PPB = 26.67\%$ (王可青等, 1999), 羊柴(*Hedysarum leave*): $PPB = 46.7\%$ (葛颂等, 1999)), 说明准噶尔无叶豆是具有较高遗传多样性的狭域分布特有种, 这与对 *Agave victoriae-reginae* (Martinez et al., 1999), *Florida rosemary*(Dolan et al., 1999)等植物的研究结果相一致, 即狭域分布的物种也可以具有较高的遗传多样性

水平。

这可能是因为: (1)准噶尔无叶豆兼性生殖的繁育方式。野外调查及研究表明, 准噶尔无叶豆的有性生殖为兼性异交, 需要传粉者(另文发表)。由于有性重组往往能产生新的基因组合(基因型), 因此可以保持较高水平的遗传变异; 同时, 准噶尔无叶豆通过无性克隆繁殖, 使带有新的有利基因型的个体迅速占领某个地区, 高的遗传变异水平得以维持

(Silander, 1979)。(2)多克隆起源及偶尔的种苗更新使得居群保持高的克隆多样性。准噶尔无叶豆所有居群均为多克隆居群,并且不同基因型的比率高(表6),可推测准噶尔无叶豆居群在建立之初可能是由多个不同基因型个体组成,即是多起源的,导致了丰富的克隆多样性。此外,准噶尔无叶豆种群中还存在低水平的种苗更新。据2005–2006年的野外调查发现,准噶尔无叶豆的种群结实率低(12–16%),并且在自然状态下种子的萌发率低($\leq 3\%$),种子转化为幼苗的能力也很低。仅在一个居群中发现了3株实生幼苗,说明它在自然状态下的有性繁殖过程中存在薄弱环节。但类似于其他一些克隆植物,如 *Rubus saxatilis* (Eriksson & Bremer, 1993) 和 *Fritillaria camtschatcensis* (Shimizu *et al.*, 1998), 居群中偶尔存在的种苗更新(如15年1次)也足以维持居群高的遗传变异水平。

此外,对准噶尔无叶豆基因型种类和分布进行分析,发现该种的克隆多样性很高($D = 0.8972$) (表6),且居群间的克隆分化较大,局部基因型所占比例达到93.92%,没有广布基因型。说明准噶尔无叶豆基因型的地域性分布强。作者认为克隆繁殖的自然属性以及片断化的居群分布格局对克隆基因型分布产生了影响。准噶尔无叶豆居群中的许多基因型很可能具有局部的生态适应性,从而造成了居群之间克隆(基因型)的分化。

3.2 准噶尔无叶豆居群遗传分化及成因分析

Ellstrand 和 Elam (1993) 认为, $G_{ST} > 0.1$ 意味着居群间分化程度较高,准噶尔无叶豆的 $G_{ST} = 0.2978$, 表明它是居群间分化较大的一类多年生植物,居群间的基因流是很有限的。采用 AMOVA 进一步分析结果也表明居群间存在较高水平的遗传分化。分析认为生境片断化而导致的基因交流障碍是最主要的原因。首先,由于片断化居群的个体数量少,居群规模小,不足以维持较多的传粉者,导致传粉者数量减少、活动强度降低或者发生不利于传粉的变化,都有可能降低基因流。在前期对准噶尔无叶豆的传粉生物学进行研究时,发现该种仅有虫媒传粉一种方式。其次,准噶尔无叶豆居群之间常相隔数公里至几十公里,也限制了传粉昆虫的活动。第三,准噶尔无叶豆果实靠重力传播,散播距离也有限,这往往形成一定的家系结构,加剧了居群间的分化(葛颂, 1998)。第四,不同的生境适应或

许是导致居群分化的另外一个因素。虽然准噶尔无叶豆仅分布在风蚀流沙地,但受地貌、地形的影响,不同地点的沙物质的机械组成和沙层水分条件存在明显差异,造成了复杂的微生境。准噶尔无叶豆群落可划分为5大群丛并表现出不同的群落特征也说明了这一差异。不同微生境所造成的环境压力可能会对不同基因型进行选择,导致居群之间的遗传分化。

最后,人类活动所带来的干扰也有可能影响居群间的遗传分化。本研究发现,与沙漠腹地中居群所面临的筑路、修渠、石油开采等工程行为所造成的切割与干扰不同,位于沙漠边缘的F, G居群主要受到农业开垦的影响,使得居群面积减小甚至消失,其居群克隆多样性(包括基因型比率、Simpson指数及均匀度指数)较沙漠腹地的居群高。因此推测外界干扰也可能对物种的遗传分化及遗传结构造成一定的影响。但有关不同的干扰方式及强度对居群遗传后果的作用及机制尚有待于进一步研究。

综上所述,准噶尔无叶豆是一个遗传变异及克隆多样性水平相对较高的物种。但由于人为干扰引起的生境丧失和生境片断化在一定程度上造成了该物种的遗传变异丧失,并且是造成该物种居群遗传分化的主要原因。因此,对于该物种的保护应从以下几个方面考虑:(1)保护准噶尔无叶豆的栖息地,减少人为干扰和破坏。(2)保护准噶尔无叶豆的遗传完整性。在取样策略上,要采集尽可能多的居群的种子。(3)尽管准噶尔无叶豆群体中平均克隆所含分株数不多(每个基株平均只有1.05–2.27个分株),但不同克隆间相差很大,意味着不同克隆可能具有不同的生长潜力或适合度,从而可能具有不同的竞争能力。因此,有必要加强对不同克隆系的保护力度,在采集种子时要尽可能采集不同克隆系的种子。

参考文献

- Васильченко (1941) ФЛОРА СССР. Том XI (苏联植物志 (第十一卷)). pp. 310–311. (in Russian)
- Buza L, Young A, Thrall P (2000) Genetic erosion, inbreeding and reduced fitness in fragmented populations of the endangered tetraploid pea *Swainsona recta*. *Biological Conservation*, **93**, 177–186.
- Chen CD (陈昌笃), Zhang LY (张立运), Hu WK (胡文康) (1983) The basic characteristics of plant communities, flora and their distribution in the sandy district of Gur-

- bantunggut Desert. *Acta Phytoecologica et Geobotanica Sinica* (植物生态学与地植物学丛刊), **7**, 89–99. (in Chinese)
- Chung MG (1999) Allozyme diversity in the endangered shrub *Abeliophyllum distichum* (Oleaceae): a monotypic Korean genus. *International Journal of Plant Science*, **160**, 553–559.
- Dolan RW, Yahr R, Menges ES, Halfhill MD (1999) Conservation implications of genetic variation in three rare species endemic to Florida rosemary scrub. *American Journal of Botany*, **86**, 1556–1562.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 217–242.
- Ellstrand NC, Roose ML (1987) Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany*, **74**, 123.
- Eriksson O, Bremer B (1993) Genet dynamics of the clonal plant *Rubus saxatilis*. *Journal of Ecology*, **81**, 533–542.
- Fager EW (1972) Diversity: a sampling study. *The American Naturalist*, **106**, 293–310.
- Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 408–417.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, UK.
- Ge S (葛颂) (1998) The review and prospect of researches in genetic structure of plant populations. In: *Progress in Plant Science I* (植物科学进展(第 I 卷)) (ed. Li CS(李承森)). pp. 1–15. Higher Education Press, Beijing. (in Chinese).
- Ge S (葛颂), Wang KQ (王可青), Dong M (董鸣) (1999) Genetic diversity and clonal structure of *Hedysarum leave* in Mo Us Sandland. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **41**, 301–306. (in Chinese with English abstract)
- Ge XJ, Yu Y, Zhao NX, Chen HS, Qi WQ (2003) Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae). *Biological Conservation*, **111**, 427–434.
- Ge YQ (葛永奇), Qiu YX (邱英雄), Ding BY (丁炳扬), Fu CX (傅承新) (2003) An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba*. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11**, 276–287. (in Chinese with English abstract)
- Hamrick JL, Holden RL (1979) Influence of microhabitat heterogeneity on gene frequency distribution and gametic phase disequilibrium in *Avena barbata*. *Evolution*, **33**, 521–533.
- Kahmen S, Poschod P (2000) Population size, plant performance, and genetic variation in the rare plant *Arnica montana* L. in the Rhon, Germany. *Basic and Applied Ecology*, **1**, 43–51.
- Leng X (冷欣), Wang ZS (王中生), An SQ (安树青), Feng J (冯珏), Liu YH (刘玉虹), Wang GM (王国明) (2005) ISSR analysis of genetic diversity of *Ilex integra*, an insular endemic plant. *Biodiversity Science* (生物多样性), **13**, 546–554. (in Chinese with English abstract)
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, **6**, 381–398.
- Li A, Ge S (2001) Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. *Annals of Botany*, **87**, 585–590.
- Liu YX (刘焯心) (1987) *Flora in Desertis Reipublicae Populorum Sinarum* Tomus II. (中国沙漠植物志 (第二卷)), pp. 174. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Martinez-Palacios A, Eguiarte LE, Furnier GR (1999) Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany*, **86**, 1093–1098.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **70**, 3321–3323.
- Panda S, Martin J, Aguinagalde I (2003) Chloroplast and nuclear DNA studies in a few members of the *Brassica oleracea* L. group using PCR-RFLP and ISSR-PCR markers: a population genetic analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**, 1122–1128.
- Primack RB (1993) *Essentials of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Qian W (钱韦), Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元) (2000) Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **42**, 741–750. (in Chinese with English abstract)
- Rohlf FJ (2000) *NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York.
- Shea KL, Furnier GR (2002) Genetic variation and population structure in central and isolated populations of balsam fir, *Abies balsamea* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, **89**, 783–791.
- Sheng Y, Zhang WH, Pei KQ, Ma KP (2004) Population genetic structure of a dominant desert tree, *Haloxylon ammodendron* (Amaranthaceae), in the southeast Gurbantunggut Desert detected by RAPD and ISSR markers. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **46**, 675–681.
- Shimizu T, Hatanaka Y, Zentoh H (1998) The role of sexual and clonal reproduction in maintaining population in *Fritillaria camtschatcensis* (L.) Ker-Gawl (Liliaceae). *Ecological Research*, **13**, 27–39.
- Silander JA (1979) Microevolution and clone structure in *Spartina patens*. *Science*, **203**, 628–660.
- Stewart CN, Excoffier L (1996) Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). *Journal of Evolutionary Biology*, **9**, 153–171.
- Tomimatsu H, Ohara M (2003) Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camtschatcense* (Trilliaceae). *Biological Conservation*,

- 109, 249–258.
- Tsumura Y, Ohba K, Strauss SH (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 40–45.
- Vasseur L (2001) Allozymic diversity of *Allium tricoccum* (Ait.) Solander var. *burdickii* Hanes in isolated populations of Nova scotia (Canada). *Plant Systematics and Evolution*, **228**, 71–79.
- Wang KQ (王可青), Ge S (葛颂), Dong M (董鸣) (1999) Allozyme variance and clonal diversity in the rhizomatous grass *Psammochloa villosa* (Gramineae). *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **41**, 537–540. (in Chinese with English abstract)
- Widén B, Cronberg C, Widén M (1994) Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, **29**, 245–263.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) *POPGENE Version 1.31, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis*. University of Alberta and Centre for International Forestry Research.
- Yin LK (尹林克), Tan LX (谭丽霞), Wang B (王兵) (2006) *Rare and Endangered Higher Plants Endemic to Xinjiang* (新疆珍稀濒危特有高等植物), pp.74–75. Xinjiang Scientific and Technical Publishing House, Urumq. (in Chinese)
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 413–418.
- Zhang FM (张富民), Ge S (葛颂) (2002) Data analysis in population genetic. I. Analysis of RAPD data with AMOVA. *Biodiversity Science* (生物多样性), **10**, 438–444. (in Chinese with English abstract)
- Zhang J (张娟), Zhang DY (张道远), Yin LK (尹林克) (2003) Genomic DNA extraction and RAPD experiment conditions of *Tamarix hispida*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), **23**, 253–256. (in Chinese with English abstract)
- Zhang LY (张立运), Hai Y (海鹰) (2002) Plant communities excluded in the book of “The Vegetation and Its Utilization in Xinjiang”. I. The desert plant communities. *Arid Land Geography* (干旱区地理), **25**, 84–89. (in Chinese)
- Zhang P (张萍), Dong YZ (董玉芝), Wei Y (魏岩), Hu CZ (胡成志) (2006) Analysis of genetic diversity of *Haloxylon persicum* (Chenopodiaceae) in Xinjiang by ISSR. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **28**, 359–362. (in Chinese with English abstract)
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)—anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**, 176–183.

(责任编辑: 王艇 责任编辑: 时意专)