

生境破碎对缙云卫矛种群遗传多样性的影响*

胡世俊¹, 闫晓慧¹, 何平², 张春平²

(1. 西南林业大学 林学院 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 昆明 650224 ;

2. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715)

摘要 生境破碎是许多物种生存的主要威胁,不同物种对生境破碎的反应不同,破碎后种群遗传多样性的信息对物种的保护具有较大的指导意义。缙云卫矛(*Euonymus chloranthoides* Yang)为重庆地区特有濒危植物,由于公路修建、旅游景点开发等因素的影响,缙云卫矛种群遭受了严重的生境破碎,居群小且处于隔离状态。对位于缙云山的该物种4个居群的遗传多样性分析表明,59.38%的遗传变异存在于居群内,40.62%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,居群间遗传分化较大与该物种居群间的长期隔离、花粉、种子的扩散距离较近有关。遗传多样性最高的居群的多态位点百分率为64.58%,但最小的板子沟居群多态位点百分率仅29.17%,表明小居群不利于遗传多样性的维持。居群间的基因流(N_m)偏小,为0.7309,难以抵消遗传漂变引起的居群间的遗传分化。聚类分析显示距离最近的居群首先聚在一起,表明该物种居群间遗传分化大小受空间距离远近影响。研究认为对该物种的有效保护应加强对小种群的就地保护,增强居群间的基因流,防止小居群遗传多样性的进一步丧失。

关键词 生境破碎 缙云卫矛 遗传多样性 濒危植物

中图分类号: Q16

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2013)02-0026-04

种群的遗传结构反映了种群进化过程并将决定该种群未来的发展状况^[1]。生境破碎化会降低居群内遗传变异,增加居群间遗传分化,影响居群短期及长期的生存力^[2]。生境破碎的一个主要后果是由于遗传漂变、近交、基因流下降导致的遗传多样性的丧失。虽然基因流可以抵消遗传漂变的后果,但花粉流及种子流随着种群间距离的增大而降低^[3]。生境破碎将导致居群大小的降低及传粉系统的扰乱,且很多植物表现出对生境破碎的敏感性^[4]。所以,生境破碎化成为许多物种生存的主要威胁,物种的有效保护需要深入了解种群对生境破碎化的反应^[5]。

三峡库区具有丰富的生物资源,在中国的生态环境保护中具有重要意义,随着最近几十年三峡库区工业化、城镇化的逐步推进,很多当地物种的栖息地被破坏,库区的生物多样性受到了严重威胁,很多物种到了灭绝的边缘。缙云卫矛(*Euonymus chloranthoides* Yang)为重庆地区特有濒危植物^[6],属卫矛科(Celastraceae),花期7~8月,花较小,果期12月至第二年1月,蒴果,种子大,散落在母株附近。本研究团队野外观察表明该种植物很少有传粉昆虫到访,且分布范围和数量都非常有限,仅于北碚缙云山和鸡公山、重庆统景镇、万盛黑山谷等地发现有种群分布^[7],该物种一些

种群正遭受生境片断化的威胁,有些小种群处于严重隔离状态,并呈现逐渐缩小的趋势^[8]。因此,对已遭受生境破碎化种群的遗传多样性变化的研究对该物种的保护具有较大的指导意义。

1 材料与方法

1.1 居群的选取

在重庆北碚区缙云山北温泉公园内选一个居群记为北温泉公园居群,在北温泉公园外选两个居群记为北温泉居群1和北温泉居群2,北温泉公园居群与北温泉居群1相距约300m,其间有一停车场、公路、房屋相隔,北温泉居群1与北温泉居群2相距约150m,其间有一主要由香樟、马尾松组成的混交林相隔。在缙云山板子沟选一居群记为板子沟居群,该居群与上面3个居群相距较远,约有几公里的距离。这4个居群由大到小排列为:北温泉居群1、北温泉居群2、北温泉公园居群、板子沟居群。2006年3月,从各居群取缙云卫矛嫩叶放入硅胶中,带回实验室,贮于冰箱中。据各居群的大小取样数目为:北温泉公园居群取10株,北温泉居群1取15株,北温泉居群2取13株,板子沟居群取6株。

1.2 DNA提取与PCR扩增

* 收稿日期 2012-11-25 网络出版时间 2013-03-16 13:37

资助项目 国家自然科学基金项目(No.30070080;No.31200319)

作者简介 胡世俊,男,讲师,博士,研究方向为植物保护生物学,E-mail:shijunhu@126.com 通讯作者 何平,E-mail:heping196373@126.com

网络出版地址 http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20130316.1337.201302.26_006.html

叶片采用 CTAB 法提取 DNA,核酸蛋白仪检测纯度后用于 PCR 扩增。根据 ISSR 部分引物序列,经上海生物工程有限公司合成后,筛选出 5 条可以扩增出清晰谱带的引物。反应体系为:10 × PCR Buffer 2 μL, 2 mmol · L⁻¹ dNTP 2 μL, 5 μmol · L⁻¹ 引物 0.8 μL, 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 2 μL, 25 ng · μL⁻¹ 的模板 DNA 2 μL, 5 U · μL⁻¹ Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 以水补齐至总体积 20 μL。扩增条件为:94 °C 5 min, 94 °C, 30 s, 52 或 53 °C 45 s, 72 °C 2 min, 45 个循环。最后在 72 °C 下延伸 7 min。不同引物的退火温度稍有差异。引物序列及退火温度见表 1。将 PCR 扩增产物在用 0.5 × TBE 配制的 2% 琼脂糖凝胶中电泳分离,以 100 bp DNA ladder Marker(100 ~ 1 500 bp)作为相对分子质量标准,在 120 V 的恒流下电泳 1 h。电泳结束后在凝胶成像系统中检测记录扩增产物的泳带,保存图片。

表 1 各引物的碱基序列及退火温度

Tab. 1 Sequence of ISSR primers used for experiment and their anneal temperature

引物号	序列	退火温度/°C
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	52
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	52
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	53
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	52
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	52

注:Y 为 C 或 T。

1.3 数据分析

将电泳图谱转化成 0,1 数据矩阵,采用 Popgene 1.31 软件^[9]计算出缙云卫矛各居群的 Nei's 基因多样性(H)、Shannon 信息指数(I)。计算缙云卫矛居群总体水平上的多态位点百分率(PPB)、居群内基因多样性(H_s)和总的基因多样性(H_t)、基因分化系数(G_{ST})、基因流(N_m)。

采用 Shannon 表型多样性指数计算群体内和群体间的基因多样性: $H = -\sum P_i \log_2 P_i$ 。这里 H 为 Shannon 表型多样性指数, P_i 为一条扩增产物存在的频率。用 H 来计算两种水平的多样性: H_{pop} 和 H_{sp} 。 H_{pop} 是居群内平均多样性的测度, H_{sp} 是种内总多样性, H_{pop}/H_{sp} 是居

群内多样性所占的比例 ($H_{sp} - H_{pop}$)/ H_{sp} 为居群间多样性所占比例^[10]。

2 结果

居群内基因多样性和总基因多样性分别为 0.124 2 和 0.209 2。根据遗传多样性水平在居群内和居群间的分化($H_t - H_s$)得出居群之间的 Nei's 基因分化系数为 0.406 2。这说明在物种水平上,有 59.38% 的遗传变异存在于居群内,而 40.62% 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。

对缙云卫矛缙云山 4 个居群的遗传分析表明:总体而言,缙云卫矛的遗传多样性水平较高,在所有检测到的清晰而且可重复的 48 个有效位点当中,多态位点有 47 个,在物种水平上,多态位点百分率是 97.92%, Nei's 基因多样性和 Shannon 信息指数分别是 $0.201 7 \pm 0.145 2$ 和 $0.331 9 \pm 0.198 5$ 。从各个居群来看(表 2),以板子沟居群($PPB = 29.17\%$)的遗传多样性水平最低,北温泉居群 2($PPB = 64.58\%$)的最高。其他两居群的遗传多样性处于中等水平。

根据 Shannon 指数估计的居群间遗传多样性水平 ($(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$)为 38.21%,与 Nei's 基因分化系数(0.406 2)基本一致。居群间的基因流偏小,为 0.730 9,难以阻碍居群间的遗传分化。

由 Popgene 1.31 软件得出的聚类图(图 1)反映出板子沟居群与其他几个居群间遗传距离较远,距离最近的居群首先聚在一起,表明该物种居群间遗传分化大小受空间距离远近影响。

3 讨论

缙云山的缙云卫矛种群在遭受生境破碎之后呈严重的斑块状分布,各斑块状居群大小不等,且隔离程度彼此不同,因此缙云山是一个研究生境破碎化对缙云卫矛居群遗传多样性影响的理想场所。缙云卫矛为地方特有种,一般认为稀有种或分布区狭窄的特有物种遗传多样性水平较广布种低^[11],这也许是它们的居群较小及居群隔离所致^[12],这类物种的小居群及居群间的隔离引起基因流下降,增加了遗传漂变、近交衰退的

表 2 缙云卫矛居群的遗传多样性

Tab. 2 Population genetic diversity of *E. chloranthoides*

居群	等位基因数 N_a /个	有效等位基因数 N_e /个	Nei's 基因多样性 H	Shannon's 指数 I	多态位点百分率 $PPB/\%$
板子沟	1.291 7 ± 0.459 3	1.148 1 ± 0.297 5	0.088 9 ± 0.160 2	0.137 3 ± 0.234 4	29.17
北温泉居群 1	1.604 2 ± 0.494 2	1.194 9 ± 0.232 5	0.136 1 ± 0.143 7	0.225 6 ± 0.218 8	60.42
北温泉居群 2	1.645 8 ± 0.483 3	1.201 2 ± 0.270 1	0.135 3 ± 0.148 7	0.225 9 ± 0.217 8	64.58
北温泉公园	1.500 0 ± 0.505 3	1.221 3 ± 0.320 9	0.136 5 ± 0.175 9	0.214 0 ± 0.254 5	50.00

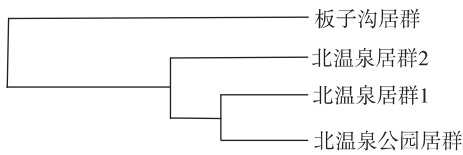


图1 缙云山缙云卫矛4个居群的遗传分化聚类图

Fig. 1 Dendrogram for 4 populations of *E. chloranthoides* Yang from Mt. Jingyun

机率,导致居群遗传变异的下降及居群间的遗传分化^[13],另外,许多特有的呈岛状分布的植物的遗传多样性下降可能是对局部的岛状环境的适应的结果,或由于扩散能力的丧失等因素导致^[11];但也有一些呈斑块状分布的地方特有物种的遗传多样性并不低^[14]。缙云卫矛许多小居群也呈斑块状分布,相互间处于不同程度的隔离状态,但该物种缙云山的几个居群却依然保持着较高的遗传多态性,总的水平上,其多态位点百分率为97.92%。虽然该物种总体上遗传多态性并不低,属于分布分布区小但遗传多样性不低的那一类,但对于板子沟居群来说,其多态位点比率最低,为29.17%,Shannon's 指数(0.1373)、表型多样性指数(3.9034)均最低。板子沟居群遗传多态性水平最低,有两点原因:1)居群个体数量最小,是所研究的所有居群中最小的一个,居群个体数量小往往与等位基因的固定,多态性水平的降低联系在一起;2)居群的隔离程度最大。隔离的小居群没有外界基因流的输入,产生小居群的一系列的遗传学效应不可避免,其中包括遗传多态性的降低。因此可以看出,该物种的小居群不利于遗传多样性的保持,若生境破碎得不到有效的遏制,随着居群的减小及隔离的增加,会有更多的缙云卫矛居群沦为隔离的小居群,其整个物种的遗传多样性将会逐渐的丧失掉,加剧该物种的受威胁状况。

异花授粉的植物倾向于显示出高的遗传变异性及低的居群间分化^[15],缙云卫矛各个居群之间的 Nei's 基因分化系数为0.4062,根据 Shannon 指数估计的居群间遗传多样性水平为38.21%,说明大部分的遗传多样性存在于居群的内部,相比之下,小部分的遗传多样性存在于居群间。居群间基因分化系数(0.4062)几乎是 Hamrick 等^[16]得出的平均值(0.2280)的两倍,说明居群间的花粉流及种子流微弱或受阻。

实验结果表明缙云卫矛居群间的基因流偏小,为0.7309,当该值小于1时,理论认为基因流不能有效地防止居群间的遗传分化。研究生境破碎对物种的影响的关键就是要了解居群间基因流的量^[17]。一般情况下,对于昆虫传粉来说,当居群大小减小时,由花粉介导的从大居群流向小居群的基因流的比率会增加,因为昆虫在大居群中花费的时间比在小居群中多,当隔离距离较小时这种现象比较明显,因此在较小的隔离距离内,小居群比大居群与其它居群杂交的机率会更

多^[18]。许多研究也表明稀有植物的小居群比大居群能接收到更多的花粉带来的基因流^[18],但对缙云卫矛来说,当隔离增加时,超过传粉昆虫的传粉距离时,居群间的基因流便会下降。本研究团队在野外观察发现缙云卫矛的传粉昆虫较少,且不喜运动,居群间的花粉流不会很强,另外缙云卫矛的种子较大,种子主要散布在母株的周围,其花粉流与种子流很难越过居群间的空间距离。缙云卫矛为长寿多年生灌木,实验所用材料取自居群的成年植株,所得出的基因流水平是代表过去的基因流水平,由于破碎带来的隔离的增加,当前的基因流水平降低的趋势应该会更明显。基因流偏小,将会导致居群的遗传多样性逐渐下降,残存种群间基因流的量最终决定着生境破碎带来的遗传结果^[19]。因此,可以偿试采用居群间授粉、移栽等措施来增强该物种居群间的基因流。

综上,本研究表明生境破碎已不利于缙云卫矛居群间的基因流,已导致了小居群的遗传多样性的丧失。因此对该物种的保护首先应遏制生境的进一步破碎化,其次应增加居群间的基因流,防止近交衰退,防止小居群遗传多样性的进一步丧失。

参考文献:

- [1] 夏婧, 郭友好. 邓氏马先蒿遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(6): 565-568.
Xia J, Guo Y H. ISSR Analysis for genetic diversity of *Pedicularis dunniana*[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2006, 24(6): 565-568.
- [2] Bacles C F E, Lowe A J, Ennos R A. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape[J]. Molecular Ecology, 2004, 13(3): 573-584.
- [3] Scobie A R, Wilcock C C. Limited mate availability decreases reproductive success of fragmented populations of *Linnaea borealis*, a rare, clonal self-incompatible plant[J]. Annals of Botany, 2009, 103(6): 835-846.
- [4] Klank C, Pless A R, Ghazoul J. Effects of population size on plant reproduction and pollinator abundance in a specialized pollination system[J]. Journal of Ecology, 2010, 98(6): 1389-1397.
- [5] Ezard T H G, Travis J M J. The impact of habitat loss and fragmentation on genetic drift and fixation time[J]. Oikos, 2006, 114(2): 367-375.
- [6] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录, 第一卷, 红色名录[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 315.
Wang S, Xie Y. China species red list, vol. 1, red list[M]. Beijing: Higher Education Press, 2004: 315.
- [7] 何平. 珍稀濒危植物保护生物学[M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 2005: 221.
He P. Conservation biology of the rare & endangered plants [M]. Chongqing: Southwestern Normal University Press, 2005:

221.

- [8] 胡世俊,何平,王瑞波,等. 濒危植物缙云卫矛不同种群的种子萌发研究 [J]. 林业科学 2007 43(5) :42-47.
Hu S J, He P, Wang R B, et al. Seed germination characters of populations of the endangered plant *Euonymus chloranthoides* [J]. Scientia Silvae Sinica 2007 43(5) :42-47.
- [9] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, et al. POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis [M]. Edmonton, Alberta, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 1997.
- [10] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法 [M]. 浙江科学技术出版社, 1999 :134.
Ji W Z, Su B. Principles and methodologies of genetic diversity studies [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1999 :134.
- [11] Lopez-Pujol J, Bosch M, Simon J, et al. Population genetics and conservation priorities for the critically endangered island endemic *Delphinium pentagynum* subsp. *formenterianum* (Ranunculaceae) [J]. Biodiversity and Conservation, 2003, 12(9) :1937-1951.
- [12] Neel M C, Ellstrand N C. Patterns of allozyme diversity in the threatened plant *Erigeron parishii* (Asteraceae) [J]. American Journal of Botany 2001 88(5) :810-818.
- [13] Young A, Boyle T, Brown T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants [J]. Trends in Ecology & Evolution, 1996, 11(10) :413-418.
- [14] 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) :2389-2396.
- [15] Gomes V, Collevatti R G, Silveira F A O, et al. The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil [J]. Conservation Genetics, 2004, 5(2) :157-165.
- [16] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. New Forests, 1992, 6(1/2/3/4) :95-124.
- [17] Yao X, Ye Q, Kang M, et al. Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiostyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China [J]. New Phytologist, 2007, 176(2) :472-480.
- [18] Ellstrand N C. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics [J]. Oikos, 1992, 63(1) :77-86.
- [19] Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches [J]. Molecular Ecology, 2008, 17(24) :5177-5188.

Resources Environment and Ecology in Three Gorges Area

Effects of Habitat Fragmentation on Population Genetic Diversity of Endangered Plant *Euonymus chloranthoides* Yang

HU Shi-jun¹, YAN Xiao-hui¹, HE Ping², ZHANG Chun-ping²

(1. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China (State Forestry Administration), Faculty of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224 ; 2. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract : Habitat fragmentation is the main threat to the survival of many species, species response to habitat fragmentation differently; the information of genetic diversity has great significance to protect species. *Euonymus chloranthoides* Yang is an endangered plant endemic to Chongqing. The population of this plant in Jinyun Mountain has been fragmented seriously because of the highway construction, tour development and so on. Some populations are small and isolated. Four populations in Jinyun maintain were selected to study the effects of habitat fragmentation on population genetic diversity of *E. chloranthoides*. The results of ISSR experiment show that the G_{ST} is 0.406 2 which means 59.38% of the genetic diversity exists within the population, and 40.62% of the genetic diversity exists among populations, the level of population differentiation is high due to long isolation, low dispersal distance of pollen and seed. The PPB of the population with highest genetic diversity is 64.58%, The genetic diversity of Banzigou population, the smallest one, is the lowest, and the PPB of this population is 29.17%, which means small population do harm to the maintenance of genetic diversity. The gene flow (N_m) is 0.730 9, which is difficult to counteract the differentiation caused by genetic drift. Cluster analysis show the nearest populations cluster first, which mean that the genetic differentiation is affected by spatial distance. In-situ conservation should be strengthened to protect the small populations, and gene flow among populations should be improved to prevent the further genetic loss of small populations.

Key words : habitat fragmentation; *Euonymus chloranthoides* Yang; genetic diversity; endangered plant

(责任编辑 方 兴)