黑龙江野生莲遗传多样性及其地理式样

薛建华 卓丽环 周世良 *

(东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040; 中国科学院植物研究所系统与进化植物学重点实验室, 北京 100093;
大庆师范学院生命科学系, 大庆 163712. * 联系人, E-mail: slzhou@ibcas.ac.cn)

摘要 用 RAPD 和 ISSR 两种分子标记方法对黑龙江省的 47 份野生莲、俄罗斯兴安斯克保护区的 2 份野生莲和中国其他省份的 27 份栽培莲进行遗传多样性研究. 20 条 RAPD 引物共扩增出 113 个位点, 多态位点占 71.68%, 期望杂合度 0.1583. 野生莲的多态位点占 50.44%, 期望杂合度 0.1241; 栽培莲的多态位点占 53.98%, 期望杂合度 0.1651. 16 条 ISSR 引物扩增出 90 个位点, 多态位点占 41.11%, 期望杂合度 0.0851. 野生莲的多态位点占 28.89%, 期望杂合度 0.0661; 栽培莲的多态位点占 32.22%, 期望杂合度 0.0963. 野生莲中, 乌苏里江流域、松花江流域和黑龙江流域之间的遗传分化很小, 流域之间的遗传方差仅占 21.68% (RAPD, $G_{st} = 0.1312$) 和 15.11% (ISSR, $G_{st} = 0.1352$). 在所有的遗传变异中, 野生型和栽培型之内的遗传方差占 73.25% (RAPD) 和 81.11% (ISSR), 野生型和栽培型之间的遗传方差占 19.17% (RAPD) 和 13.17% (ISSR), 而 3 个野生流域群和 1 个栽培群之间的遗传方差仅占 7.58% (RAPD) 和 5.72% (ISSR). NJ 分析表明, 黑龙江省的野生莲与其他地方的栽培莲有明显的分化. 在野生莲中, 松花江中游地区的野生莲可能是黑龙江野生莲的残遗中心, 由松花江中游向下游地区和黑龙江与乌苏里江流域扩散. 从黑龙江野生莲比较低的遗传多样性判断, 野生莲经历了瓶颈效应、建立者效应和再生效应(rebirth effect). 鉴于莲的古老性、遗传变异的稀少及其在湿地生态系统中的重要地位, 建议全面保护非常宝贵的黑龙江野生莲资源, 尤其是有可能为起源地的松花江中游地区的野生莲栖息地.

关键词 莲 RAPD ISSR 遗传多样性 地理式样 再生效应

遗传多样性是物种多样性和生态系统多样性的基础^[1,2], 是生物多样性研究的重要内容. 研究物种的遗传多样性, 可为其保护和利用提供科学依据, 具有实际意义. 遗传多样性的检测可以在形态、细胞、生理生化和分子等不同层次进行. 在分子水平上, 遗传多样性的研究主要用分子标记技术, 如等位酶、RAPD 和 ISSR 等^[3,4]. 分子标记技术分析遗传物质本身或其直接产物蛋白质的遗传变异, 消除了环境因素的影响, 是非常理想的技术, 已经成为遗传多样性研究的主要手段^[5,6].

莲科(Nelumbonaceae)植物是一群非常古老的被子植物, 大约出现于一亿三千五百万年前. 现存的莲科植物仅有莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)和美洲黄莲(*N. lutea* Willd.)两种, 为冰期的孑遗植物之一, 是活化石植物. 莲是重要的经济作物和观赏植物, 广泛分布在亚洲和大洋洲北部. 莲在中国分布很广, 北从黑龙江省, 南至海南的三亚市, 西从天山北麓, 东至台湾^[7].

野生莲是栽培莲的祖先, 是培育优良莲品种的天然基因库. 由于自然及人为因素的影响, 野生莲正

受到由于生境丧失和栽培品种遗传入侵的威胁, 使其居群面积缩小, 与栽培莲的差异模糊. 在中国, 黑龙江省是确实存在野生莲的少数地区之一. 我们的调查发现, 黑龙江省的 60 多个地点有野生莲分布^[8]. 野生莲与栽培莲相比, 具有花单瓣、心皮数多、藕细且纤维化程度高等特征. 有关莲的遗传多样性研究多集中在栽培品种上^[9~11], 对野生莲的研究极少. 虽然有些学者曾对黑龙江的野生莲做过资源调查和形态方面的观测^[8,12~14], 但其遗传多样性的现状及其分布格局仍不为人们所了解. 随着降水减少和人们对湿地资源的不合理开发, 导致湿地收缩, 黑龙江省的野生莲同样面临着生境片段化, 居群的面积减小甚至正在消失的严重威胁. 近年来, 旅游事业不断兴旺, 风景名胜的建设引入栽培品种, 当地野生的荷花面临栽培品种遗传入侵的形势越来越严峻. 为了了解黑龙江省野生莲遗传资源的现状, 有效地保护这些野生资源, 我们于 2004 年对其整个分布区进行了详细踏查, 采集了实验材料. 本研究用 ISSR 和 RAPD 技术分析这些样品的结果, 旨在客观而全面地评价黑龙江省野生莲的遗传多样性, 了解其遗传变异的地理

分布规律, 为野生莲的遗传多样性保护提供科学依据。同时为探讨莲的起源、演化与散布提供佐证。

1 材料和方法

() 材料来源. 我们于 2004 年 8~9 月对黑龙江野生莲进行了调查并采集实验材料. 共涉足 40 个野生莲的自然分布点, 采集到野生莲实验材料 49 份(图 1, 表 1), 其中包括俄罗斯兴安斯克保护区野生莲 2 份. 我们采集了栽培莲 27 份(表 1)用作对照. 新鲜叶片用电热毯迅速干燥后, 用塑料膜密封保存.

() 总DNA提取. DNA用CTAB法提取^[15], 并将DNA浓度调至 5~10 ng/μL, 作为RAPD和ISSR分析的DNA模板.

() RAPD 和 ISSR 分析. 从 74 条 RAPD 引物中筛选出 20 条扩增效果最好的引物进行 RAPD 扩增; 从

45 条 ISSR 引物中筛选出 16 条扩增效果最好的引物进行 ISSR 扩增. PCR 反应体系为: ddH₂O 5.4 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.0 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ L, 2 mmol/L dNTP 2.0 μ L, 50% DMSO 3.2 μ L, 5 μ mol/L 引物 2.0 μ L, 5 U Taq 0.2 μ L, DNA 模板 4 μ L, 总体积 20 μ L.

扩增反应在 Biometra 的 T-1 Thermocycler PCR 仪上进行. RAPD 扩增程序为: 94 预变性 4 min; 94 变性 15 s, 37 退火 45 s, 72 延伸 90 s, 35 个循环; 72 延伸 4 min, 最后 4 保存. ISSR 扩增程序: 94 预变性 1.5 min; 94 变性 40 s, 45 退火 40 s, 72 延伸 90 s, 34 个循环; 94 变性 45 s, 44 退火 45 s, 72 延伸 5 min, 最后 4 保存. PCR 产物用含 0.5% 溴化乙锭(EB)的 1.5% 琼脂糖(Promega 公司)凝胶电泳检测, 用 Bio-Rad 凝胶成像系统照像, Quantity One 软件分析.

图 1 野生莲在黑龙江省的分布

图1 野生莲在黑龙江省的分布

表 1 莲实验材料来源

流域	地点	代号
黑龙江省松花江流域群	阿城市巨源乡白渔村	H-Acheng
	宾县二龙山	H-Binxian-1
	宾县满井乡车家店村莲花泡	H-Binxian-2
	大庆经济学校	H-Daqing-1
	大庆水库	H-Daqing-2
	方正县德善乡莲花村	H-Fangzheng
	林口市莲花镇莲花村	H-Linkou-1
	林口市莲花镇莲花村姑子庙	H-Linkou-2
	牡丹江市黑瞎子沟莲花村	H-Mudanjiang-1
	牡丹江市莲花泡	H-Mudanjiang-2
	七台河市桃山区北山金河公墓	H-Qitaihe
	尚志市乌吉密镇	H-Shangzhi-1
	尚志市亚布力尚礼村	H-Shangzhi-2
	通河县	H-Tonghe-1
	通河县祥顺镇东六方村	H-Tonghe-2
	依兰县红星乡晨光村	H-Yilan
	肇源县城内	H-Zhaoyuan-1
	肇源县二站镇莲花村莲花泡	H-Zhaoyuan-2
黑龙江省黑龙江流域群	富锦市新龙村与新林村之间莲花泡	H-Fujin
	富锦市新建乡七桥村	H-Fujin
	抚远市海青镇永发村附近赵立国养殖场	H-Fuyuan
	桦川县江川农场八队	H-Huachuan-1
	桦川县江川农场莲花泡	H-Huachuan-2
	佳木斯市金山屯腰泡	H-Jiamusi-1
	佳木斯市连江口西莲花泡	H-Jiamusi-2
	萝北县肇兴镇先锋村莲花泡	H-Luobei
	同江市八岔赫哲族乡十里泡	H-Tongjiang-1
	同江市八岔赫哲族乡新宏村西北莲花泡	H-Tongjiang-2
	同江市乐业镇光明村	H-Tongjiang-3
	同江市三村镇三村南 4 里莲花泡	H-Tongjiang-4
	同江市银川一队老于家泡子	H-Tongjiang-5
黑龙江省乌苏里江流域群	俄罗斯兴安斯克保护区	Russia-1, Russia-2
	宝全岭中心医院	H-Baoquanling
	虎林市西大沟	H-Hulin-1
	虎林市虎头镇飞机场村黑鱼泡	H-Hulin-2
	虎林市虎头镇窑营泡	H-Hulin-3
	虎林市月牙湖	H-Hulin-4, H-Hulin-5, H-Hulin-6
	鸡西市柳毛乡莲花村	H-Jixi
	密山市二中附近莲花泡	H-Mishan-1
	密山市柳花仙香荷公园	H-Mishan-2
	兴凯湖白泡子(东方第一池)	H-Xingkaihu-1
	兴凯湖北泡子	H-Xingkaihu-2
	兴凯湖农场	H-Xingkaihu-3, H-Xingkaihu-4, H-Xingkaihu-5
	兴凯湖农场 31 连	H-Xingkaihu-6
栽培莲群	安徽	Anhui
	北京	Beijing-1, Beijing-2
	重庆	Chongqing
	福建	Fujian
	甘肃	Gansu
	广东	Guangdong
	广西	Guangxi

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/972005-1310>

表 1(续)

流域	地点	代号
	河南	Henan
	湖北	Hubei-1, Hubei-2, Hubei-3, Hubei-4, Hubei-5, Hubei-6, Hubei-7, Hubei-8
	江苏	Jiangsu-1, Jiangsu-2
	江西	Jiangxi-1, Jiangxi-2
	山东	Shandong-1
	上海	Shanghai-2
	山西	Shanxi
	四川	Sichuan-1, Sichuan-2
	天津	Tianjin

() 数据处理. 同一位点(分子量相同的条带)扩增条带的有/无用 1/0 的方法统计, 生成原始数据矩阵, 然后用 Popgene^[16] 软件计算遗传多样性参数(多态性位点数 K 及其百分率 P , 等位基因数 N_a , 有效等位基因 N_e , 期望杂合度 H_e , Shannon 信息指数 I , 群体的基因分化系数 G_{st} 和基因流 Nm 等). 为了分析黑龙江野生莲遗传变异的地理式样, 根据野生莲可能沿河道传播的推想, 我们按采样地点所处的主河流流域将样品分成 4 群: (1) 松花江流域群; (2) 黑龙江流域群; (3) 乌苏里江流域群; (4) 栽培莲群(表 1). 前 3 个群组成“野生型”, 栽培莲群为“栽培型”. 用 AMOVA^[17] 软件分析遗传变异在群内和群间, 野生型和栽培型之间的分布, 分析遗传多样性的空间格局. 各样品之间的遗传相似性, 用 PAUP^[18] 计算 Nei-Li 距离, 再用 MEGA3^[19] 软件构建 NJ 树.

2 结果

20 条 RAPD 引物和 16 条 ISSR 引物均扩增出清晰的条带, 共得到 203 个位点(表 2). 20 条 RAPD 引物扩增的总位点数为 113 个, 每条引物扩增的位点数为 1~11 条, 平均每条引物扩增出 5.65 个位点, 其中有 6 条引物的扩增结果全部为单态带, 14 条引物扩增出多态带. 16 条 ISSR 引物扩增的总位点数为 90 个, 每条引物扩增的位点数为 1~13 条, 平均每条引物扩增出 5.63 个位点, 其中 7 条引物的扩增结果全部为单态位点, 9 条引物扩增出多态位点.

2.1 野生莲的遗传多样性

() 多态位点(表 3). 在全部 76 个样品的 113 个 RAPD 位点中, 多态位点为 81 个, 占 71.68%. 在群体水平上, 松花江流域群多态位点为 36 个, 占 31.86%. 黑龙江流域群多态位点为 41 个, 占 36.28%. 乌苏里江流域群多态位点为 28 个, 占 24.78%. 野生型的多态位点为 57 个, 占 50.44%. 栽培群为多态位点为 61 个, 占

53.98%. 乌苏里江群的多态性最低, 栽培群最高.

在全部 76 个样品的 90 个 ISSR 位点中, 多态位点 37 个, 占 41.11%. 在群体水平上, 松花江流域群多态位点为 19 个, 占 21.11%. 黑龙江流域群多态位点为 11 个, 占 12.22%. 乌苏里江流域群多态位点为 16 个, 占 17.78%. 野生型的多态位点数为 26 个, 占 28.89%. 栽培群为 29 个, 占 32.22%. 黑龙江流域群的多态性最低, 栽培群最高.

() 等位基因平均数与有效等位基因平均数(表 3). 野生群体 RAPD 位点的等位基因平均数(N_a)为 1.2478~1.3628, 乌苏里江流域群最小; 有效等位基因平均数(N_e)为 1.1672~1.2191, 松花江流域群最小. 野生型的等位基因平均数为 1.5044, 有效等位基因平均数为 1.1992; 栽培型的等位基因平均数为 1.5398, 有效等位基因平均数为 1.2875. 物种水平上, 等位基因平均数为 1.7168, 有效等位基因平均数为 1.2496.

野生群体 ISSR 位点的等位基因平均数在 1.1222~1.1778 之间, 有效等位基因平均数为 1.0753~1.1153, 黑龙江流域群均最小. 野生型的等位基因平均数为 1.2889, 有效等位基因平均数为 1.1038; 栽培型的等位基因平均数为 1.3222, 有效等位基因平均数为 1.1605. 物种水平上, 等位基因平均数为 1.4111, 有效等位基因平均数为 1.1319.

() 期望杂合度和 Shannon 多样性指数(表 3). 野生群体 RAPD 标记 Nei's 期望杂合度(H_e)为 0.0974~0.1261, Shannon 多样性指数(I)的变化范围为 0.1420~0.1872, 乌苏里江流域群均最低. 野生型的期望杂合度为 $H_e = 0.1241$, $I = 0.1959$; 栽培型的期望杂合度 $H_e = 0.1651$, $I = 0.2477$. 物种水平上, $H_e = 0.1583$, $I = 0.2528$.

野生群体 ISSR 标记 Nei's 期望杂合度(H_e)为 0.0434~0.0682, Shannon 多样性指数(I)的变化范围为 0.0647~0.1029, 黑龙江流域群均最低. 野生型的期望

表 2 RAPD 和 ISSR 引物序列及每个引物的扩增结果

引物编号	引物序列(5'-3')	位点总数	多态位点数	多态位点百分率%
S0051	AGCGCCATTG	7	6	85.71
S0053	GGGGTGACGA	9	4	44.44
S0056	AGGGCGTAAG	8	8	100
S0199	GAGTCAGCAG	5	4	80
S0205	GGGTTTGCA	2	0	0
S0206	CAAGGGCAGA	6	5	83.33
S0212	GGGTGTGTAG	3	0	0
S0217	CCAACGTCGT	8	7	87.5
S0344	CCGAACACGG	8	8	100
S0350	AAGCCCCGAGG	5	3	60
S0353	CCACACTACC	5	4	80
S0355	TGTAGCAGGG	4	2	50
S0385	ACGCAGGCAC	11	11	100
S0401	GTGGTGGCT	4	0	0
S0404	GGCGTTTGC	7	5	71.42
S0407	CCGTGACTCA	1	0	0
S0496	AGTGCAGCCA	1	0	0
S0498	AGGCTGGGTG	1	0	0
S2123	GTGCCACTTC	7	4	57.14
S2125	CAAGCCGTGA	11	10	90.9
总计		113	81	71.68
ISSR-02	(CAC)4-RC	10	4	40
ISSR-03	(CT)8-RC	7	1	14.28
ISSR-05	(CTC)4-RC	5	3	60
ISSR-09	(GTG)4-RC	1	0	0
ISSR-12	(ACTG)4	1	0	0
ISSR-13	(AGTG)4	3	0	0
ISSR-15	GGA-(GTG)4	4	0	0
ISSR-18	(AC)7-T	3	0	0
ISSR-23	(GA)7-CC	7	4	57.14
ISSR-24	(GT)7-CC	7	4	57.14
ISSR-25	(CAC)4-GC	9	6	66.67
ISSR-27	(CTC)4-GC	13	12	92.30
ISSR-29	(CT)8-TG	7	2	28.57
ISSR-38	(AG)7-YC	2	0	0
ISSR-44	(CT)8-AC	3	0	0
ISSR-45	(CT)8-GC	8	1	12.5
总计		90	37	41.11

表 3 莲的遗传多样性^{a)}

群体编号	群体名称	样本大小	K	P	Na	Ne	He	I
RAPD	1 松花江流域群 S-group	18	36	31.86 %	1.3186(0.4680)	1.1672(0.2973)	0.1003(0.1708)	0.1518(0.2495)
	2 黑龙江流域群 H-group	15	41	36.28 %	1.3628(0.4830)	1.2191(0.3486)	0.1261(0.1908)	0.1872(0.2742)
	3 乌苏里江流域群 U-group	16	28	24.78 %	1.2478(0.4337)	1.1739(0.3331)	0.0974(0.1811)	0.1420(0.2596)
	4 栽培群 Cultivated group	27	61	53.98 %	1.5398(0.5006)	1.2875(0.3788)	0.1651(0.2016)	0.2477(0.2855)
	1+2+3 野生型 Wild group	49	57	50.44%	1.5044(0.5022)	1.1992(0.3054)	0.1241(0.1689)	0.1959(0.2461)
	1+2+3+4 总体 Species	76	81	71.68%	1.7168(0.4526)	1.2496(0.3102)	0.1583(0.1711)	0.2528(0.2453)
ISSR	1 松花江流域群 S-group	18	19	21.11%	1.2111(0.4104)	1.1153(0.2668)	0.0682(0.1498)	0.1029(0.2186)
	2 黑龙江流域群 H-group	15	11	12.22%	1.1222(0.3294)	1.0753(0.2306)	0.0434(0.1265)	0.0647(0.1835)
	3 乌苏里江流域群 U-group	16	16	17.78%	1.1778(0.3845)	1.1021(0.2597)	0.0591(0.1447)	0.0881(0.2095)
	4 栽培群 Cultivated group	27	29	32.22%	1.3222(0.4699)	1.1605(0.2976)	0.0963(0.1673)	0.1468(0.2441)
	1+2+3 野生型 Wild group	49	26	28.89%	1.2889(0.4558)	1.1038(0.2348)	0.0661(0.1343)	0.1060(0.2008)
	1+2+3+4 总体 Species	76	37	41.1%	1.4111(0.4948)	1.1319(0.2505)	0.0851(0.1457)	0.1370(0.2170)

a) K, 多态位点数; P, 多态位点百分数; Na, 观察到的等位基因数目; Ne, 有效等位基因数目; H, Nei's 基因多样性; I, Shannon 信息指数. 括号内数据为标准误差

杂合度为 $He = 0.0661$, $I = 0.1060$; 栽培型的期望杂合度 $He = 0.0963$, $I = 0.1468$. 物种水平上, $He = 0.0851$, $I = 0.1370$.

2.2 不同群体的基因多样性及其分布

从野生型、栽培型和物种 3 个方面分析莲的基因多样性(表 4). RAPD 标记的 Ht 值分别为 0.1242, 0.1651 和 0.1486, ISSR 标记 Ht 值分别为 0.0658, 0.0963 和 0.0790. 野生型的 3 个流域群间, RAPD 和 ISSR 的 Gst 值分别为 0.1312 和 0.1352, Nm 值分别为 3.3245 和 3.1875.

2.3 莲遗传变异的分布式样

为了区分莲遗传变异的分布式样, 我们对遗传方差进行 3 类分解对比(表 5): () 野生型的流域群内和流域群间: RAPD 和 ISSR 的变异在流域群间分别为 21.68%和 15.11%, 在流域群内分别占 78.32%和 84.89%; () 野生型和栽培型: 存在于野生型或栽培型之间的 RAPD 和 ISSR 变异分别占总变异的 24.02%和 16.85%, 存在于野生型或栽培型之内的变异占 75.98%和 83.15%; () 综合考虑 3 个野生流域群和 1 个栽培群: RAPD 和 ISSR 的变异分别仅有 7.58%和 5.72%存在于各群之间, 分别有 19.17%和 13.17%存在于野生型和栽培型之间; 分别有 73.25%和 81.11%的变异存在于各群内.

2.4 不同分布地点莲的遗传相似性

综合 RAPD 和 ISSR 数据, 野生类型样品间的 Nei-Li 遗传距离为 0.005~0.182. 最大值 0.182 出现在

松花江流域的阿城材料与黑龙江流域的萝北材料之间; 最小值出现在乌苏里江流域的虎林材料与黑龙江流域的同江材料. 根据 Nei-Li 遗传距离, 采用 NJ 方法构建的不同分布地点莲材料的遗传关系(图 2)表明, 除了 Hubei-6 和 Jiangsu-2 外, 黑龙江省的野生类型的莲与来自全国各地的栽培类型的莲有比较大的差别. 在野生类型的莲中, 松花江流域的莲彼此亲缘关系较近. 黑龙江和乌苏里江流域的莲具有非常密切的关系, 以至于这两类分子标记均不能有效地区别它们.

3 讨论

3.1 黑龙江野生莲的遗传多样性较低

物种遗传多样性的丰富程度受许多因素的制约, 如物种的进化历史、群体所经历的进化事件、物种的生殖模式以及生境的特点等, 其中进化历史的长短是最重要的因素之一. 据 Soule^[20]估计, 杂合度增加百分之一需要一百万年的时间. 莲是个非常古老的物种, 在地球上存在至少已有 1.35 亿年. 莲在黑龙江省存在的历史也十分悠久, 在依兰县曾发现早第三纪的莲化石^[21]. 黑龙江的野生莲表现出不同于栽培莲的“野生性状”^[8,12-14]. 与古老的子遗植物, 如桫欏^[22]、银杏^[23]、水杉^[24]、北美鹅掌楸与鹅掌楸^[25]和珙桐^[26]等相比, 野生莲的遗传多样性高于桫欏, 略高于水杉, 显著低于银杏和一些被子植物(表 6). 莲遗传多样性的特殊性表明, 古老物种的遗传多样性不一定丰富. 因为物种的古老性只是影响遗传多样性的因素之一, 同样不可忽视的是居群的历史. 一些研

表 4 莲在群体和物种水平的基因多样性^{a)}

类型	样本大小	RAPD				ISSR			
		Ht	Hs	Gst	Nm^*	Ht	Hs	Gst	Nm^*
野生型	49	0.1242(0.0287)	0.1079(0.0226)	0.1312	3.3245	0.0658(0.0180)	0.0569(0.0142)	0.1352	3.1875
栽培型	27	0.1651(0.0406)	—	—	—	0.0963(0.0280)	—	—	—
物种	76	0.1486(0.0272)	—	—	—	0.0790(0.0195)	—	—	—

a) Nm , Gst 基因流估计, $Nm = 0.5(1-Gst)/Gst$

表 5 莲不同群体的遗传变异的 AMOVA 分析

对比类型	变异来源	RAPD		ISSR	
		方差分量	百分率(%)	方差分量	百分率(%)
流域群	流域群之间	1.5987	21.68	0.4826	15.11
	流域群之内	5.7762	78.32	2.7112	84.89
野生型与栽培型	野生型和栽培型之间	1.9039	24.02	0.5656	16.85
	野生型和栽培型之内	6.0239	75.98	2.7903	83.15
巢式分析	野生型和栽培型之间	1.5119	19.17	0.4404	13.17
	3 个野生流域群和 1 个栽培群之间	0.5980	7.58	0.1911	5.72
	3 个野生流域群和 1 个栽培群之内	5.7762	73.25	2.711	81.11

图 2s:// 基于 Nei-Li 遗传距离构建的样品之间的 NJ 树

表6 莲与一些古老物种的遗传多样性的比较

物种	<i>P</i>	<i>He</i>	数据来源
RAPD			
莲(<i>Nelumbo nucifera</i>)	50.44	0.1583	本研究
桫欏(<i>Alsophila spinulosa</i>)	27.97%	0.0770	[22]
水杉(<i>Metasequoia glyptostrobos</i>)	38.60%	0.1305	[24]
北美鹅掌楸(<i>Liriodendron tulipifera</i>)	—	0.4330	[25]
鹅掌楸(<i>Liriodendron chinense</i>)	—	0.3955	[25]
珙桐(<i>Davidia involucrata</i>)	97.03%	0.3336	[26]
ISSR			
莲(<i>Nelumbo nucifera</i>)	28.89%	0.0661	本研究
银杏(<i>Ginkgo biloba</i>)	70.45%	0.2408	[23]

究表明,在古老物种的进化历程中,居群很可能经历严峻的瓶颈效应,使其遗传多样性显著降低,典型的如夏腊梅^[3]。

对莲的遗传多样性起决定作用的因素还在于居群所经历的历史事件及其遗传效应。莲在东北的生活历史无疑是非常悠久的,但这并不意味着每个居群都有很长的历史。3种机制可能对莲居群遗传多样性有决定性作用:瓶颈效应(bottleneck effect)、建立者效应(founder effect)和再生效应(rebirth effect)。莲的生长环境受气候的制约,雨水充足,湿地面积扩大,莲的分布面积就会增加。相反,干旱使湿地萎缩,居群发生间断,个体死亡,遗传多样性丢失。许多水生植物都经历过瓶颈效应,如*Egeria densa*^[27],也不能排除莲同样经历过类似的瓶颈效应。莲居群的扩大主要通过地下茎的延伸,而居群数目的增加只能通过遗传体(genet,地下茎(藕)和果实(莲子))的传播。莲的遗传体的传播方式主要是水流和动物。莲藕和莲蓬可能被洪水携带到新的静水湿地。野外观察还发现,莲蓬有被鸟类啄的现象,莲子还可能通过大型鸟类得到扩散。虽然到达新定居点遗传体的数量有限,但对克隆生长和不存在自交不亲和问题的莲来说,完全能由少数甚至一个个体建立起新的居群。这样由少数“建立者”形成的居群,其遗传多样性是非常有限的。然而,莲子的寿命很长,原来有莲分布的水体由于某些原因而消失,经过一段时间后又重新长出莲,这种现象我们称之为再生(rebirth)。居群由于古老种子的再生而使遗传多样性增加的现象我们称为再生效应(rebirth effect)。莲的再生是种子库作用的特殊形式,典型的例子如北京温泉太子坞的莲^[28]。黑龙江省阿城市巨源乡白渔村村民几年前挖养渔池时挖出的莲子,现已繁殖成片。再生效应比较复杂,因为种子库的来源可能跨越很长时间而同时萌

发,所以不能通过再生居群的遗传多样性判断种子库的遗传多样性,而且同一地点的不同再生居群(如果存在这种现象的话)的遗传多样性可能不同。因此,要确切了解莲的遗传多样性,首先必须了解其克隆结构和基因流动水平。

物种的生殖模式也是影响其遗传多样性的重要因素之一。有性繁殖存在突变和重组两种遗传变异来源,而克隆繁殖只存在突变一种机制。所以,理论上克隆繁殖植物的遗传多样性相对较低。然而,克隆植物的遗传多样性要比原先预想的复杂得多,其遗传多样性比理论预料的高^[29],如羊柴(*Hedysarum leave*)^[30]和羊草(*Leymus chinensis*)^[31]等许多克隆植物的遗传多样性并不低。对克隆植物遗传多样性的理解与对克隆的理解和相应的取样策略有关。以莲为例,莲的繁殖特性为有性兼克隆繁殖,不存在自交不亲和问题。莲的繁殖能力很强,一个个体就能繁衍出很大的面积。在南方地区,一根藕一年就可覆盖约20 m²的地域。如果在一个水体中莲的克隆结构很大,即使是异花受粉也可能发生在同一个克隆结构之内,其遗传效应等于自交。因此,如果把同一片水域作为一个居群,其遗传多样性必定不高。目前,我们对野生莲群体克隆结构的大小还不清楚,要确切地了解莲克隆结构对其遗传多样性评估的影响程度,还有待于用多态性更高的分子标记(如AFLP和SSR)揭示克隆结构,采用空间自相关分析,确定合理的取样策略。

植物的遗传多样性除了遗传因素外,还受外界生态环境因素,即选择因素的影响。水生植物的水体生长环境基质相对稳定,生态因子的变化幅度相对较小,环境的异质性较小,所以水生植物的遗传多样性水平通常较低。美国东南部的大叶香蒲(*Typha latifolia*) 74居群在10个酶系统上均没有遗传变异^[32]或仅在一个居群的一个位点有变异^[33]。早期的研究多用同工酶技术分析功能基因的表达产物,这些产物会受功能的限制,因此遗传多样性比较低。同样是大叶香蒲,用VNTR(variable number tandem repeat)分析其遗传多样性,虽然指标的数值增大不少,但与其他植物相比,遗传多样性仍然很低^[34]。可见,莲非常有限的遗传变异并不是个别现象,可能是水生植物的普遍问题。然而,水生植物的遗传多样性也可以很高,如芦苇^[35]。

植物的野生型是物种的主要基因库,栽培型是野生型人工定向选择的结果,在选择过程中遗传多样性

丧失是不可避免的。一般情况下,野生型比栽培型具有高的遗传多样性,如 *Enteromorpha prolifera*^[36], *Beta vulgaris*^[37], *Paeonia lactiflora*^[38] 和人参^[39,40] 等。本研究结果却发现黑龙江省野生莲的遗传多样性低于栽培的莲(表 3, 4), 究其原因可能是本实验所用的栽培莲来自全国不同的省份, 来源广泛, 谱系多样, 遗传背景比较复杂, 而野生莲仅局限于黑龙江流域。本研究揭示的遗传多样性显著小于同类的研究, 如汪岚等人^[9] 的 82.41% 和郭宏波等人^[10] 的 93.23% 的多态位点百分率, 与类似研究的材料包括了莲和美洲黄莲的种间杂交品种有一定关系, 它们的遗传多样性并不仅是莲一个物种的遗传多样性。另外, 目前观赏莲的品种培育处于最兴旺阶段, 以从野生类型选育和杂交育种为主, 品种数目多, 代表了大量的野生变异类型, 从而丰富了栽培莲的遗传变异。当经过一段时间的栽培, 形成少数当家品种后, 如果不能有效地保存稀有栽培品种, 栽培品种的遗传资源可能存在丢失的危险。

3.2 黑龙江野生莲的起源一致性

黑龙江省的野生莲主要分布于乌苏里江流域、松花江流域和黑龙江流域(图 1)。从图 2 可以看出, 除个别样品外, 黑龙江省的野生莲内部具有更大的遗传相似性, 而与栽培类型的遗传分化明显, 说明黑龙江省野生莲的起源是一致的, 从其他地区多次传入的可能性比较小。邹喻苹等人^[41] 用 RAPD 标记分析了来自江西、湖南、河北和黑龙江哈尔滨的莲。结果表明, 江西和湖南的材料具有更大的遗传相似性, 哈尔滨的莲与河北的莲比较接近。本研究结果表明, 栽培类型虽然来源复杂, 但彼此之间的遗传相似性更高, 亲缘关系更近。黑龙江的野生莲与俄罗斯的野生莲具有很高的遗传相似性, 说明包括俄罗斯远东地区在内的整个黑龙江流域的野生莲具有相同的起源。

在黑龙江省广大的分布区内, 不同地点的莲样品之间的遗传分化很小, 遗传距离为 0.005~0.182。分子方差分析(AMOVA)表明, 乌苏里江流域、松花江流域和黑龙江流域之间有一定程度的基因交流(根据 RAPD 和 ISSR 估计的 N_m 值分别为 3.3245 和 3.1875, 表 4), 遗传变异仅占总变异量的 15.11% 或 21.68%(表 5)。从遗传相似性上看, 松花江流域的野生莲与乌苏里江流域和黑龙江流域的野生莲之间差异相对明显, 乌苏里江流域与黑龙江流域的野生莲没有明显的分化(图 2)。这种现象可能是因为野生莲残留于松花江

流域中游地区, 后来才扩散到乌苏里江流域和黑龙江流域。由于黑龙江流域和乌苏里江流域的地势比较低, 洪水很容易携带种子或藕流向下游, 加上莲很强的地下茎生长, 使两流域的基因交流相对于松花江中游来说更频繁。由于 RAPD 和 ISSR 标记技术本身的限制, 要彻底揭开黑龙江省野生莲的起源和扩散的秘密, 必须在莲的整个分布区取样, 以美洲黄莲为参照, 采用 DNA 序列、AFLP 和 SSR 等多种标记技术全面揭示莲的进化和地理变异规律。

3.3 黑龙江野生莲遗传多样性的保护

物种的遗传多样性是其生存及进化的前提和基础。遗传多样性越丰富, 在环境发生变化时生存下来的可能性就越大, 遗传多样性丧失将对其生存带来不利的影响^[42,43]。本研究结果表明, 黑龙江省野生莲与栽培莲之间有明显的遗传分化, 野生莲带有栽培莲所不具有的遗传资源。所以, 保护野生莲也就是保护尚未被认识和使用的遗传资源。

我们的野外调查发现, 由于人类的干扰, 黑龙江省湿地退缩, 野生莲栖息地片断化比较严重甚至消失。莲是个自交亲和物种, 主要传粉昆虫为甲虫和蜂类。由于莲的克隆繁殖特性, 在 20 m 甚至更长的距离之内的花朵可能都属于一个克隆, 自花传粉的比例高, 而自交的后果就是遗传漂变, 遗传多样性降低。莲栖息地之间距离的扩大更增加了基因交流难度, 近交加剧, 遗传重组减少, 遗传多样性进一步降低。

目前在我国, 野生莲在湿地生态系统中的重要地位和其遗传多样性保护的重要性没有得到充分的认识, 但早在 1988 年俄罗斯就将莲列入濒危动植物红皮书。由于黑龙江野生莲的遗传多样性低, 需要广泛地加以保护。特别要保护可能是野生莲的残留地的松花江中上游地区。这些地区人口密集, 人为干扰大, 其生境更加脆弱。如生长在呼兰河流域的莲已于 15 年前彻底消失, 整个肇源县仅存一个野生莲的分布点。这些地区可建立野生莲的自然保护区, 保护其生境。

致谢 中国科学院植物所系统与植物学进化植物学重点实验室葛颂博士提供部分 RAPD 引物; 田红丽硕士研究生在采集其他省份栽培荷花材料和实验过程中给予帮助。在实验材料的野外采集过程中曾得到黑龙江省同仁的热情帮助, 在此表示谢忱。本工作得到国家自然科学基金(批准号: 30121003)的资助。

参 考 文 献

- 1 葛颂, 洪德元. 遗传多样性及其检测方法. 见: 钱迎青, 马克平, 编. 生物多样性研究的原理与方法. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 123~140
- 2 Avise J C, Hamrick J L. Conservation Genetics, Case Histories from Nature. New York: Chapman & Hall, 1996
- 3 周世良, 叶文国. 夏腊梅的遗传多样性及其保护. 生物多样性, 2002, 10(1): 1~6
- 4 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性. 植物学报, 2000, 42(7): 741~750
- 5 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001. 140~149
- 6 王和勇, 陈敏, 廖志华, 等. RFLP, RAPD, AFLP 分子标记及其在植物生物技术中的应用. 生物学杂志, 1999, 8: 24~26
- 7 王其超, 张行言. 中国荷花品种图志. 北京: 中国林业出版社, 2005. 6
- 8 薛建华, 卓丽环, 郭玉民, 等. 黑龙江野生莲资源的现状及保护. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2005, 21(2): 87~91
- 9 汪岚, 韩延闯, 彭欲率, 等. ISSR 标记技术在莲藕遗传研究中的运用. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(3): 20~22
- 10 郭宏波, 柯卫东, 李双梅, 等. 不同类型莲资源的 RAPD 聚类分析. 植物遗传资源学报, 2004, 5(4): 328~332
- 11 彭欲率, 韩延闯, 汪岚, 等. 应用 AFLP 技术检测莲藕遗传多样性的初步研究. 分子植物育种, 2004, 2(6): 823~827
- 12 董振发, 辛孝先, 朱官有, 等. 黑龙江省莲资源及利用. 北方园艺, 1996, 2: 51~53
- 13 董振发, 辛孝先, 朱官有, 等. 黑龙江省莲资源及利用. 北方园艺, 1996, 3: 64~65
- 14 王其超, 陈耀东, 辛春德, 等. 黑龙江野生莲资源考察. 中国园林, 1997, 13 (4): 39~41
- 15 Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19: 11~15
- 16 Yeh F C, Yang R C, Boyle T, et al. POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Canada, 1997
- 17 Excoffier L P, Smouse E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 1992, 131: 479~491
- 18 Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 2002
- 19 Kumar S K, Tamura, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 131~149[DOI]
- 20 Soulé M. Allozyme variation: its determination in space and time. In: Ayala F J, ed. Molecular Evolution. Sunderland: Sinaur Assoc, 1976. 60~77
- 21 陶君容. 中国晚白垩纪至新生代植物区系发展演变. 北京: 科学出版社, 2000. 136
- 22 王艇, 苏应娟, 李雪雁, 等. 子遗植物桫欏种群遗传变异的 RAPD 分析. 生态学报, 2003, 23(6): 1200~1205
- 23 葛永奇, 邱英雄, 丁柄扬, 等. 子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析. 生物多样性, 2003, 11(4): 276~287
- 24 李春香, 杨群, 周建平, 等. 水杉自然居群遗传多样性的 RAPD 研究. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 60~63
- 25 罗光佐, 施季森, 尹冬明, 等. 利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸与鹅掌楸种间遗传多样性. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 9~13
- 26 宋丛文, 包满珠. 天然珙桐群体的 RAPD 标记遗传多样性研究. 林业科学, 2004, 40(4): 75~79
- 27 Carter M C, Sytsma M D. Comparison of the genetic structure of North and South American populations of a clonal aquatic plant. Biological Invasions, 2001, 3(2): 113~118[DOI]
- 28 徐本美, 邹喻苹, 魏玉凝, 等. 关于古代“太子莲”的研究. 种子, 1999, 103(4): 32~35
- 29 夏立群, 李建强, 李伟. 论克隆植物的遗传多样性. 植物学通报, 2002, 19(4): 425~431
- 30 葛颂, 王可青, 董鸣. 毛乌沙地根茎灌木羊柴的遗传多样性和克隆结构. 植物学报, 1999, 41(3): 301~306
- 31 崔继哲, 祖元刚, 聂江城. 羊草种群遗传分化的分析. 数据的统计分析. 生态学报, 2002, 22(7): 982~989
- 32 Mashburn S J, Sharitz R R, Smith M H. Genetic variation among *Typha* populations of the southeastern United States. Evolution, 1978, 32: 681~685
- 33 Sharitz R R, Wineriter S A, Smith M H, et al. Comparison of isozymes among *Typha* species in the eastern United States. Am J Bot, 1980, 76: 1297~1303
- 34 Keane B S, Pelikan G P, Toth M K, et al. Genetic diversity of *Typha latifolia* (Typhaceae) and the impact of pollutants examined with tandem-repetitive DNA probes. Am J Bot, 1999, 86(9): 1226~1238
- 35 Guo W R, Wang R H, Zhou S L, et al. Genetic diversity and clonal structure of *Phragmites australis* in the Yellow River Delta of China. Biochem System Ecol, 2003, 31: 1093~1109[DOI]
- 36 Huh M K, Lee H Y, Lee B K, et al. Genetic diversity and relationships between wild and cultivated populations of the sea lettuce, *Enteromorpha prolifera*, in Korea revealed by RAPD markers. Protistology, 2004, 3(4): 243~250
- 37 Desplanque B P, Boudry K, Broomberg P, et al. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. Theor Appl Genet, 1999, 98: 1194~1201[DOI]
- 38 周红涛, 胡世林, 郭宝林, 等. 芍药野生与栽培群体的遗传变异研究. 药学报, 2002, 37(5): 383~388
- 39 马小军, 汪小全, 孙三省, 等. 野生人参 RAPD 指纹的研究. 药学报, 1999, 34(4): 312~316
- 40 马小军, 汪小全, 徐昭玺, 等. 人参不同栽培群体遗传关系的 RAPD 分析. 植物学报, 2000, 42(6): 587~590
- 41 邹喻平, 蔡美琳, 王晓东, 等. 古代“太子莲”及现代红花中国莲种质资源的 RAPD 分析. 植物学报, 1998, 40(2): 163~168
- 42 Saccheri L, Kuussaari M, Kankare M, et al. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. Nature, 1998, 392: 491~494[DOI]
- 43 Soulé M E, Hillis L S. No need to isolate genetics. Science, 1998, 282: 1658~1659[DOI]

(2005-08-17 收稿, 2005-12-06 接受)