

珍稀濒危植物遗传多样性研究方法及其影响因素

孙林, 耿其芳* (南京大学生命科学院, 江苏南京 210093)

摘要 遗传多样性是生物多样性的基础。深入了解珍稀濒危植物遗传多样性水平及其影响因素, 对其保护及可持续利用具有十分重要的意义。近年来, 随着标记技术的快速发展, 珍稀濒危植物遗传多样性研究的发展得到极大的推进。概述了研究珍稀濒危植物的常用标记方法, 包含形态标记、染色体标记、生化标记及 DNA 分子标记。同时, 归纳了影响珍稀濒危植物遗传多样性的影响因素。

关键词 珍稀濒危植物; 遗传多样性; 标记; 影响因素

中图分类号 S184 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)13-03793-06

Research Methods and Influencing Factors of Genetic Diversity of Rare and Endangered Plants

SUN Lin, GENG Qi-fang (College of Life Science, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093)

Abstract Since genetic diversity is the foundation of biological diversity, an in-depth understanding of the genetic diversity of rare and endangered plants and their influencing factors is of great significance to carry out the protection and sustainable utilization. In recent years, with the rapid development of marker technology, researches about the genetic diversity of rare and endangered plants have been greatly promoted. This paper provided an overview of methods of markers commonly used, including morphological marker, chromosomal marker, biochemical marker and DNA molecular marker. In addition, it summarized the impact of factors influencing the genetic diversity of rare and endangered plants.

Key words Rare and endangered plants; Genetic diversity; Markers; Influencing factors

生物多样性是近年来生物学、生态学研究的重要课题之一。对于生物多样性, 普遍接受的是美国国会技术评价办公室(1987)的定义, 即生命有机体及其赖以生存的生态综合体的多样性和变异性。一般来说, 生物多样性可以分解为 3 个层次的多样性, 即遗传多样性、物种多样性及生态系统多样性。其中, 遗传多样性即是生物多样性的基础, 也是其最重要的组成部分。遗传多样性对物种水平的多样性具有决定性的作用。这是因为遗传多样性是物种稳定性、进化潜力的来源。物种的经济和生态价值也得益于其特有的基因组成。因而, 保护生物多样性最终是要保护遗传多样性^[1]。

遗传多样性是生物的一种自然属性。它形成于自然界中生物的长期进化、发展过程, 广泛存在于各种生物体内, 不仅存在于不同物种之间、同一物种的不同种群之间, 而且存在于同一种群的不同个体之间。此外, 遗传多样性还具有特异性, 即任何物种都具有特有的基因序列和遗传结构, 也就是说生物世界中存在着极为丰富的遗传突变。种内遗传多样性的丰富度对物种的生存至关重要。一个居群(或物种)遗传多样性越高即遗传变异越丰富, 对外界环境变化的潜在适应性就越强, 越易扩展其分布范围和开拓新的环境。

物种等位基因数目或频率的变化是遗传多样性变化的本质原因。这种变化会受到很多因素的影响, 包括物种的生殖方式、遗传漂变、基因流、自然选择和基因突变等, 也包括由人为干扰或环境变化等因素导致的生境破碎化、种群隔离及物种灭绝。对珍稀濒危植物遗传多样性的研究可以揭示物种或居群的进化历史(起源时间、方式等), 探讨物种稀有或濒危原因和过程, 并且进一步分析其进化潜力。分子水平的遗传多样性研究, 一方面能够为亲本选配、后代遗传变异

程度和杂种优势的预测提供重要参考, 另一方面可以研究品种间的系谱关系, 从而进行品种鉴定、分类以及分析物种的起源与进化。

1 遗传多样性的分析方法

多样性存在于生物界的各个层级, 对应于此, 遗传多样性的分析手段也是针对于不同层级进行的。随着生物学研究层级的提高及生物学尤其是遗传学和分子生物学的发展, 检测遗传多样性的方法不断地得到提高与完善。分析方法已从传统的形态学层次、细胞(染色体)层次和生理生化层次发展到分子标记层次。尽管遗传多样性的分析方法发展迅速, 但仍未找到一种可以完全取代其他方法的技术^[2]。

1.1 形态标记(Morphological marker) 形态标记是利用植物外部形态特征的差异来区分个体的方式。株高、粒色、种子干重、叶片大小等易于观测的特征都可以用来运用形态标记的方法。由于形态表现型和基因型间存在着基因表达、调控、个体发育等复杂环节, 所选标记特征上的差异能否反映基因型水平上的差异自然成为该种标记方法成功与否的关键。

运用形态标记方法研究植物遗传多样性的经典试验就是孟德尔的豌豆试验。通过对豌豆形态表型特征的观察与统计, 孟德尔发现遗传因子的分离和自由组合定律。表型标记方法具有直接性与简便性^[3-4]。利用该方法, 可以在短时间内对研究对象的遗传多样性水平有一个粗略的了解。其缺点是数量少。通过该方法所能准确分析的基因位点很少, 所以不足以客观地评估所研究物种的多态性。况且植物的表型在遗传表达的过程中易受外部环境的影响, 所以未必所有的表型差异都能够反映基因层面上的多态性。Travis 等^[5]为了研究杂交在亚利桑那岩崖玫瑰(*Purshia subintegra* Rosaceae)这一珍稀灌木中的作用, 对美国亚利桑那州中部的 4 个种群进行表型标记和分子标记(AFLP)的分析, 发现基于表型和基于基因标记的群体间遗传距离之间的相关性很低,

基金项目 国家自然科学基金青年基金项目(31100270)。

作者简介 孙林(1987-), 男, 黑龙江牡丹江人, 硕士研究生, 研究方向: 分子生态学。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事分子生态学方面的研究。

收稿日期 2014-04-18

意味着表型标记并非总是能够准确地表征基因杂合程度。不过,表型标记直接与简便的特点仍是其他标记方法所不具备的,因此即使当前的标记技术已十分发达,表型标记的应用仍较广泛。通过与其他标记手段相结合,能够更客观地反映植物的遗传多样性水平。Borba 等^[6]通过表型、群落统计学及基因分子标记方法对巴西濒危兰科植物 *Sophranitis sincorana* 进行研究,发现表型多样性与基因多样性之间缺乏关联性,表明物种的保护不能仅应用某一种标记。金则新等^[7]比较了濒危植物夏蜡梅(*Sinocalycanthus chinensis*)大明山、大雷山与龙须山 3 个居群的果实与种子的形态变异。研究表明,果实的各项指标例如果柄长、果实重等都是大明山居群最大,龙须山居群最小,大雷山居群居中,且它们之间差异显著($P < 0.05$);而种子的各项指标均是大雷山居群最大,与大明山居群和龙须山居群差异显著($P < 0.05$)。黄焱^[8]通过研究发现中国特有的珍稀濒危植物珍珠黄杨种内存在丰富的群体间、群体内表型变异,其 8 个群体的枝叶等 17 个表型性状差异显著($P < 0.05$),变异系数较大。

值得注意的是,在其他标记方法研究因为某些原因尚不能深入应用的情况下,表型标记往往能够更直观地体现种间或种内群体间的遗传分化。李雪萍等^[9]结合形态标记及 IS-SR、AFLP 2 种分子标记技术,综合分析珙桐和光叶珙桐的差别,发现珙桐与光叶珙桐的差别仅在其叶片的形态特征方面,分子层面是否存在差异还有待于进一步研究。

1.2 染色体标记 (Chromosomal marker) 染色体是遗传物质的载体,是基因的携带者。染色体的变异主要包括染色体数目的变异和结构的变异 2 个方面。

染色体数目的变异包含整倍的和非整倍的变化 2 种情况。整倍体和非整倍体(如缺体、单体、三体等)都有其特定的细胞学特征,都可以作为一种染色体标记。Sanchez 等^[10]对发现于墨西哥的 3 个珍稀濒危的类蜀黍种群进行研究,通过对其染色体倍型的区分,结合表型、生态及分子标记等方面的特征,最终将其确定为玉蜀黍属繁茂玉米亚属的 3 个分化显著的种群。通过细胞学标记分析,Linda 等^[11]发现,对于仅存在于 Colorado Front Range 地区的珍稀植物 *Physaria bellii* 的保护,相较于种间杂交,栖息地不断减少的威胁更大。对爱达荷州一种当地特有珍稀植物 *Castilleja christii* 及另外 2 个同属物种 *Castilleja minitata*、*Castilleja linariifolia* 的染色体组进行分析,发现 3 个物种的倍型都是双倍体,试验分析的所有 *Castilleja christii* 植株个体均同时包含 *Castilleja minitata* 与 *Castilleja linariifolia* 的基因组。结合颗粒结合型淀粉合成酶 II 序列与 26 个表型特征,Danielle 等^[12]发现,*Castilleja christii* 是 *Castilleja minitata* 与 *Castilleja linariifolia* 2 个同倍体物种杂交得到的新物种。

另外,染色体结构的变异在植物中更为普遍。约 500 个个体中就会存在 1 个染色体结构变异^[13]。缺失、重复、倒位和易位是染色体结构变异的 4 种类型。此外,还可以利用染色体的形态、缢痕和随体等核型特征上的变异标记染色体水平上的多样性。

1.3 生化标记 (Biochemical marker) 植物组织的蛋白粗提物中含有许多不同的贮藏蛋白和同工酶等生物物质。生化标记即以此为标记。通过电泳和染色法,将蛋白质的多种形式转化为酶谱带型。据此,可以进行物种间亲缘关系的分析及纯度鉴定。

不同于形态标记和染色体标记,生化标记只需对采自植物的少量样品进行分析。此外,生化标记方法受环境的影响较小,可以直接反映基因产物的差异。统计结果表明,1970~2001 年间国外有关云杉属植物遗传多样性论文中,同工酶研究占 50% 以上^[14]。赵永亮等^[15]采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳技术,利用过氧化物(POD)同工酶和淀粉酶(AS)同工酶对 11 个金银花样品的遗传多样性进行分析,发现不同产区金银花的亲缘关系与其遗传本质、地理位置有关。孙彩云等^[16]利用 5 种酶系统能够成功地将供试品种和变种区分开,并划分为墨兰和春兰。不过,生化标记并非对所有编码蛋白质的基因进行分析,而是只可以分析编码可溶性酶的基因,且只能在产物易于提取和能在凝胶上电泳检测的基础上。所以,这种标记方法可分析的位点是有限的^[17]。

1.4 DNA 分子标记 (DNA molecular marker) 前面 3 种标记方法都是对基因的间接反映,而 DNA 分子标记则是以 DNA 分子碱基序列的变异为基础的遗传标记方法,更能直接地揭示植物基因组 DNA 水平上的多态性。理论上,对任何 DNA 分子片段都能进行分析,所以 DNA 分子的遗传标记几乎是无穷的。分子标记技术的出现同样是随着生物学的发展而产生的,特别是分子生物学技术的深入发展,使得分子标记技术逐渐形成更理想的标记方法。

1.4.1 RFLP. RFLP 是 DNA 限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism)的简称。RFLP 是最早的分子标记技术,由美国人 Botstein 在 1980 年提出。该方法是利用已知的限制性内切酶酶切个体基因组 DNA,然后用已标记的探针与之杂交。由于各种限制性内切酶能够识别专一的碱基序列,DNA 序列的变化会增减酶切位点的数目,因此在不同个体中与同一探针杂交的 DNA 片段会存在长度上的差异,即显示出多样性。

研究表明,运用 RFLP 技术,能够确定 2 种濒危马樱丹属植物,*Lantana depressa* var. *depressa* 和 *Lantana depressa* var. *floridana* 与外来种 *Lantana strigocamara* 之间发生杂交现象^[18]。Elansary 等^[19]还将 RFLP 技术应用于濒危水生肉食性植物 *Aldrovanda vesiculosa* 的研究。Holderegger 等^[20]应用 RFLP 技术鉴别区分珍稀濒危植物 European Black Poplar (*Populus nigra*) 与亲缘外来种 American Black Poplar (*Populus deltoides*)、杂交种 Black Poplar (*Populus canadensis*),并且该类分子标记的应用是保护这种珍稀濒危植物的前提。利用同工酶电泳及叶绿体 PCR-RFLP 相结合的方法,Machon 等^[21]对巴黎地区的濒危植物 *Equisetum variegatum* Schleicher 进行研究,发现对无性生殖的过多依赖是该物种遗传多样性过低的原因。

1.4.2 RAPD. RAPD 是随机扩增多态性 DNA(Random am-

plified polymorphism, DNA) 的简称。RAPD 技术的出现得益于 1985 年美国 Getus 公司的 Mullis 等发明的一种特异性 DNA 体外扩增技术,即聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR)^[22]。RAPD 是利用随机引物 (通常为 10 个核苷酸) 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增而产生多态性的 DNA 片段^[23],而后经琼脂糖凝胶电泳分离,经 EB 染色或放射自显影来检测 DNA 序列的多态性。

黄绍辉等^[24]通过 RAPD 技术对我国特有濒危植物连香树 (*Cercidiphyllum japonicum*) 进行研究。20 个引物共计扩增出 691 条 DNA 片段,其中多态性条带 328 条,占总条带的 47.5%。分析表明,连香树基因分化系数是 0.479 7,居群内变异占变异总量的 52.03%,基因流仅为 0.542 4。并且,推测遗传漂变可能是连香树当前遗传结构的主要成因。对仅分布于夏威夷地区的濒危植物 *Euphorbia kuwaleana* 进行 RAPD 分析,Morden 等^[25]发现尽管该物种的分布仅局限于 3 个小居群,但它的遗传多样性竟与近缘非濒危物种持平,甚至更高。高燕会等^[26]采用 RAPD 分子标记技术分析浙江省内金钱松 (*Pseudolarix amabilis*) 的遗传多样性。18 条引物在 62 个样品中可检测到 172 个可重复位点,其中多态性位点为 170 个,多态性比率为 99.2%。这证明金钱松天然种群存在较高的遗传多样性,并且建议对金钱松进行就地保存和迁地保存。周则刚等^[27]采用 RAPD 技术研究 9 个米心水青冈自然居群的遗传关系和多样性。20 条随机引物共扩出 260 个条带,其中多态性条带有 180 条,多态位点比率为 69.2%。研究表明,米心水青冈 (*Fagus engleriana* Seem.) 的遗传多样性水平处于中等,遗传分化也处于中等水平。Hoyo 等^[28]对采用同工酶及 RAPD 技术研究仅分布于伊比利亚半岛的 *Glandora oleifolia*,证实其遗传多样性水平非常低,2 个局域种群之间的遗传分化水平也极低。

此外,近些年来,RAPD 标记技术还应用于峨眉黄连 (*Coptis omeiensis* (Chen) C. Y. Cheng)^[29]、舟山新木姜子 (*Nelolsea sericea*)^[30]、小沙冬青 (*Ammopiptanthus nanus* (M. Pop.) Chengf.)^[31]、夏蜡梅 (*Calycanthus chinensis* Cheng et S. Y. Chang)^[32]、秦艽 (*Gentiana macrophylla* Pall.)^[33]、苜蓿属 (*Medicago* Linn.)^[34-36]、红豆杉属 (*Taxus* Linn.)^[37-40]、落叶木莲 (*Manglietia deciduas*)^[41]、狭叶坡垒 (*Hopea chinensis*)^[42] 等珍稀濒危物种的研究。

1.4.3 AFLP AFLP 是扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism) 的简称。AFLP 是将 RFLP 技术与 PCR 技术结合,设计人工合成的限制性内切酶通用接头以及可以序列配对的专用引物,对不同材料 DNA 酶切片段存在的差异进行选择性地扩增^[2]。在试验过程中,将双链接头连接到事先用限制性内切酶酶切后产生的 DNA 片段末端,然后以接头序列和邻近的限制性位点序列为引物结合位点进行扩增,最后分离扩增出的 DNA 片段进行检测^[43]。

对山东省紫椴 (*Tilia amurensis* Ruprecht) 进行遗传多样性的 AFLP 分析,9 对 AFLP 引物组合获得 1 370 条有效条带,充分证明 AFLP 标记技术的可靠性、稳定性与高效性^[44]。

基于 AFLP 技术分析捷克境内极度濒危种 *Potamogeton praelongus*, Kitner 等^[45]发现在仅存的一个自然种群中,*Potamogeton praelongus* 的遗传多样性水平非常低。Eduardo 等^[46]通过对伊比利亚半岛西北部特有濒危植物 *Ranunculus cabrensis* 已知的 4 个居群进行 AFLP 和 ISSR 分析,发现该物种无论在居群内还是在居群间水平上都具有较高的遗传多样性,并且通过 AMOVA 分析确定主要的遗传分化存在于居群内部。Li 等^[47]对世上仅存的 5 株天目铁木 (*Ostrya rehderiana*) 进行分析,发现这 5 株自然个体虽然多样性位点很少,但是具有中等水平的杂合度。对 150 株人繁殖的个体进行研究,发现与 5 株自然个体相比,无论是杂合度还是多态性的位点都有很明显的减少。钱鑫等^[48]对扇脉杓兰 (*Cypripedium japonicum*) 遗传多样性及遗传结构的研究发现,扇脉杓兰遗传多样性水平较低,与表型多样性并不一致,其遗传分化系数 ($G_{st} = 0.517 8$) 大于兰科植物。李晓楠等^[49]建立并优化了中国特有种华北落叶松的 AFLP 反应体系。

1.4.4 SSR SSR 是简单序列重复 (Simple sequence repeat) 的简称,是基因组中简单串联重复序列因重复次数的不同而形成的多态性^[50]。基因组中的重复序列按照重复单元的大小可分为卫星序列 (Satellite)、小卫星序列 (Microsatellite) 和微卫星序列 (SSRs)。微卫星 DNA 标记技术是 DNA 分子标记技术中极具潜力的分子标记,是目前最先进的遗传标记技术之一^[2]。

微卫星的重复单元一般在 2~5 个核苷酸,串联重复的长度可达几十甚至几百个核苷酸序列。拷贝数目的不同造成微卫星具有极为丰富的多态性。微卫星两端通常是保守序列,因此可以据该设计扩增微卫星的引物序列。直接对微卫星进行测序,然后根据两端的核苷酸序列得到引物序列,无疑是最直接、最简单的方法,但是鉴于工作量、经济等方面的考虑,通常不会选用这种方法。目前,依据相关原理而编写出的引物设计软件已经被开发出来,在科研中也得到越来越广泛的使用。同样,因为微卫星两端的引物通常是保守序列,微卫星引物在同属的亲缘关系较近的物种之间具有一定的通用性,因此近缘物种筛选法也是获取微卫星引物的主要方法之一。该方法能够大大节省投入在引物设计上的时间与成本等。张悦等^[51]从马尾松微卫星引物中筛选出红松 EST-SSR 标记,并与现有的红松基因组 SSR 标记进行对比分析。结果表明,2 组引物都能准确地反映红松种群的遗传多态性水平,新筛选的 EST-SSRs 可以用于红松种群遗传多样性研究。

SSR 标记是一种共显性的标记,符合孟德尔式的分离和遗传。此外,因数量丰富且均匀分布于整个基因组,所以 SSR 标记能够揭示较高水平的多态性。目前,该技术已被广泛应用于遗传图谱的构建、目标基因的定位及指纹图的绘制等研究中^[2]。黄海燕等^[52]通过试验建立起了适合杜仲的 SSR-PCR 反应体系,筛选出 13 对具有多态性的引物,为应用 SSR 标记方法研究杜仲的遗传多样性、亲缘关系奠定基础。覃瑞等^[53]进行了适用于野生软枣猕猴桃遗传多样性分析的

SSR 引物筛选工作。基于 SSR 标记的中国特有种迎春樱自然居群遗传多样性分析表明,迎春樱居群间的遗传分化水平较高,基因交流受阻^[54]。极度濒危植物西畴含笑(*Michelia coriacea*)的 SSR 标记、ISSR 标记研究表明,尽管生境片段化,在物种水平上,西畴含笑仍具有较高的遗传多样性,同时居群间的遗传差异很低^[55]。华仁杏(*Armeniaca cathayana* D. L. Fu et al.)是我国六大战略性干果树种之一,是近年发现的新种^[56]。秦玥等^[57]进行了该物种 SSR 标记的筛选与评价工作。白皮松(*Pinus bungeana*)是东亚唯一的三针松,是我国特有种濒危物种。周惠娟等^[58]利用 12 对微卫星引物对白皮松进行群体遗传学分析,发现其群体遗传多样性中心在秦岭南部与山西北部,遗传变异主要源自群体内部,自然居群呈现明显的谱系地理格局。秦岭地区国家三级保护野生濒危物种华中五味子(*Schisandra sphenanthera* Rdhd. et Wils.)的 SSR 分析结果表明,该物种具有丰富的遗传多样性,其遗传变异主要存在于居群内部^[59]。

1.4.5 SNP. SNP 是单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)的简称,是指染色体基因组上由单碱基的变异(转换、颠换、插入和缺失)引起的 DNA 序列多样性^[60]。其中,单碱基的转换与颠换最常见^[61]。转换是基因组某个位点上一种嘧啶/嘌呤置换另一种嘧啶/嘌呤,而颠换是嘌呤与嘧啶互换^[62]。理论上,突变可以发生在任何一种碱基上,但实际上 SNP 较多发生在 T 和 C 之间^[63]。在 4 种置换方式上,C→T(G→A)转换最常见,约占 2/3^[64]。

早在 1996 年,Lander^[65]便指出 SNP 标记象征着新的分子标记时代的开始。纵观遗传标记发展的历史,可以分为 3 代。第 1、2 代分别以 Southern 杂交技术和 PCR 技术为基础,而以 SNP 标记为代表的第 3 代分子标记则以基因序列为基础。

由于基因组 DNA 中任意碱基均有发生变异的可能,SNP 广泛分布在整个基因组中。根据 SNP 所在位置的不同,可以分为 cSNPs、iSNPs 及 pSNPs 三类,分别位于基因编码区、基因间和基因周边^[66]。根据是否对生物遗传性状产生影响,SNP 又可以分为蛋白编码 SNP 和非蛋白编码 SNP。其中,蛋白编码 SNP 会编码氨基酸序列。如果编码的氨基酸序列没有发生变化,即突变碱基与未突变碱基含义相同,那么该 SNP 是同义的;如果突变碱基与未突变碱基含义不同,所编码的氨基酸序列发生改变,那么该 SNP 是非同义的。非同义蛋白编码 SNP 往往会影响到相应蛋白质的功能。

SNP 标记具有稳定性高、代表性强、位点丰富、分布广泛等特点,并且具有二等位性,易于实现分析的自动化。随着技术手段的不断改进,SNP 标记的检测成本也将大大降低,因此 SNP 具有极高的理论与应用价值。在众多分子标记中,SNP 已成为研究最多、最具前景的标记技术之一。王佳媛等^[67]以采自四川麻咪泽和美姑大风顶 2 个自然保护区的我国特有易危物种野生凹叶木兰为材料,利用 SNP 分子标记方法,发现在扩增出的 4 条 510 bp 的序列上,平均每 73 bp 左右的序列长度上就能够检测到一个 SNP 位点,说明 2 个自然保

护区内不同居群的凹叶木兰具有较高的遗传多样性。

2 影响因素

2.1 繁育系统(Reproduce system) 植物的繁育系统通常指对后代遗传组成产生直接影响的所有有性特征。它主要包括花的综合特征、花各性器官的寿命、花开放式样、自交亲和程度和交配系统,其中交配系统是核心^[68]。由此可知,植物的繁育系统要比高等动物复杂得多。它是决定植物群体遗传结构的最主要因素^[1]。

一般而言,有性繁殖群体的遗传多样性比无性繁殖群体高。因为其遗传信息分别来源于父本与母本个体,经历过基因重组,且利于基因突变。无性繁殖的群体遗传多样性通常较低。捷克境内唯一的 *Potamogeton praelongus* 自然种群的遗传多样性偏低就是由占主导地位无性繁殖及人工培育的无性繁殖个体的栽种所导致的^[45]。

植物的遗传多样性受交配方式的影响也较大。随着自交(近交)率的提高,植物群体遗传多样性则越来越低。在自交、近交的物种中主要在种群间存在遗传的多样性,异交物种遗传的多样性则在群内^[69]。研究表明,普遍存在的自交现象是导致天目铁木(*Ostrya rehderiana*)150 株人工繁殖个体遗传多样性降低的原因之一^[47]。

在近缘物种间,有可能通过杂交发生植物种间的基因渐渗。一方面,基因渐渗能产生新的组合基因型与生态型,扩大种群遗传的多样性。另一方面,也存在物种合并的可能,特别是对于珍稀的濒危植物,种间杂交很有可能使物种毁灭。此外,风媒较虫媒种子传播的距离远,作为介导的基因流以及遗传的多样性相对较高,世代短的植物比世代长的植物遗传的多样性要丰富得多。

2.2 基因流(Gene flow) 基因流是群体间以及群体内不同个体间基因信息的传播和交流,通常通过花粉、种子以及克隆体的传播实现。基因流的程度受到传播方式、传播机制以及群体间地理距离的影响。长距离的基因流通常依靠种子的散布实现^[70]。不过,距离越长,基因流的概率越低^[71-72]。因此,居群间的地理距离越远,遗传分化的程度也就越大。广泛的基因流不但有益于维持群体内部的基因遗传多样性在较高水平,而且会使不同群体之间逐渐均一化。Eduado 等^[46]研究表明,基因流的均一化作用防止了濒危植物 *Ranunculus cabrerensis* (Ranunculaceae) 不同居群之间的差异性分化。

2.3 遗传漂变(Genetic drift) 遗传漂变是指在一个相对独立的小种群中,子代个体的等位基因易受到少数亲代个体没有产生后代,或者个别等位基因没有实现遗传的影响,而与亲代发生频率上的随机波动。一般来说,频率低的等位基因更易受到遗传漂变作用的影响,在下一代中丢失的可能性也越高。

存在奠基者效应(Founder effect)的群体中,同样存在类似情况。所谓奠基者效应是指由少数个体在远离原种群的一个新的栖息地建立新的群体,虽然个体的数量会逐渐增加,但是由于最初的少数个体只含有原种群的部分等位基

因,又无法与其他种群存在基因的交流,新群体的遗传多样性会极其有限。

瓶颈效应(Bottleneck effect)是遗传漂变的一种特殊情况。如果一个群体中的个体由于火灾、病虫害、气候剧变等原因,个体数量突然大量减少,由幸存的少数个体再次扩展形成新的群体,由于仅保留原种群的少数基因型,新种群的遗传多样性也会显著降低,便会产生瓶颈效应。Hoyo等^[28]推断 *Glandora oleifolia* (Boraginaceae)在第四纪冰川运动时代经历了数次瓶颈效应或局部种群的灭绝。利用 BOTTLENECK 软件瓶颈效应检测结果表明,白皮松群体很有可能经历了近期的瓶颈效应,同时个别群体具有历史扩张事件^[58]。与基因流的作用恰好相反,遗传漂变会使得群体内部的遗传多样性程度大大降低,不同的群落也会发生较快速的分化。

2.4 自然选择(Natural selection) 自然选择是进化生物学理论中最核心的概念,是进化过程的主要机制。自然选择学说强调物种内部存在可遗传的变异。在长期进化过程中,那些有利于物种更好适应生存环境的基因型将得到保留,而那些不利的基因型则被淘汰。

自然选择对植物表型性状的影响十分明显。一般认为,生物多样性与环境差异密切相关,自然选择作用越强,生物多样性就越丰富^[73]。经过自然选择,植物种群内部一些有利的变异得到积累,从而有可能产生适应特定生境的新的生态型甚至是新物种^[74]。不同的选择方式对植物群体的遗传多样性会产生不同的影响。一般说来,定向性选择和稳定性选择会淘汰较多的基因型,导致植物群体遗传多样性降低,而分裂性选择则会保留具有不同表型性状的基因型,使得植物群体遗传多样性增加。

2.5 人为干扰(Human disturbance) 随着人类活动的增加,人为干扰对濒危植物遗传多样性产生了深刻的影响。各种人类用地(农牧、城镇住房、修建工厂、道路桥梁等工程)的扩张、旅游业的发展以及人为因素导致的外来物种的入侵等都会造成珍稀濒危植物生境的丧失与破坏,加之对珍稀濒危植物本身的过度利用,已对物种的生存产生极为严重的威胁,并且使得人类活动已成为造成现代物种灭绝的首要原因^[75]。研究表明,夏威夷特有濒危物种 *Euphorbia kuwaleana* (Euphorbiaceae)植株个体过低(不足1 000株)主要源于外来物种的入侵、周期性的火灾^[25]。Qian等^[76]对中国特有珍稀兰花品种无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana*)进行遗传多样性及居群分化的分析,发现在物种水平上,该物种具有较大的遗传多样性,而居群水平很低,且6个居群间只有有限的基因流。结合实际生境推断,这种现象产生的原因是人类活动造成的生境丧失及破碎。

此外,全球变暖、江河污染、酸雨频发等不分国界、不限地域的全球性变化也在对整个生物圈产生越来越大的影响。

3 结语

珍稀濒危植物的遗传多样性会同时受到多种因素的影响和制约。直接作用于植物基因组,引起等位基因数目、频率发生变化的因素如植物繁育系统、遗传漂变、基因流等为

内部因素,通过其他间接方式影响植物遗传多样性的因素则为外部因素。诚然,由于人类活动的日益频繁,人为造成的植物资源的过度利用及生境的破碎、丧失已经成为威胁珍稀濒危植物生存的最主要因素,但是不容忽视的是,繁育系统、基因流、自然选择等也会严重制约物种的生存。因此,只有综合各因素的影响作用,才能制定出科学的保护措施。

参考文献

- [1] 王洪新,胡志昂.植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护[J].生物多样性,1996(2):32-36.
- [2] 马静,安平永,王彩芬,等.遗传多样性研究进展[J].陕西农业科学,2010(1):126-130.
- [3] SCALL B A. Comparison of methods for ascending genetic variation in plant conservation biology[M]//FALK D A, EHOLDINGER K. Genetics and Conservation of Rare Plants. New York:Oxford University Press,1991:123-124.
- [4] 贾继增.分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J].中国农业科学,1996(4):2-11.
- [5] TRAVIS S E, BAGGS J E, MASCHINSKI J. Disentangling the role of hybridization in the evolution of the endangered Arizona cliffrose (*Purshia subintegra*; Rosaceae): a molecular and morphological analysis[J]. Conservation Genetics, 2008, 9(5): 1183-1194.
- [6] BORBA E L, FUNCH R R, RIBEIRO P L, et al. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil[J]. Plant Systematics and Evolution, 2007, 267(1/4): 129-146.
- [7] 金则新,顾婧婧,李钧敏.基于形态及分子标记的濒危植物夏蜡梅自然居群的遗传变异研究[J].生态学报,2012(12):3849-3858.
- [8] 黄焱.珍珠黄杨遗传多样性及其资源保护与利用[D].南京:南京林业大学,2008.
- [9] 李雪萍,朱文琰,贺春玲,等.珍稀濒危植物珙桐与其变种光叶珙桐的差异初探[J].中国农学通报,2012(19):1-5.
- [10] SANCHEZ G J J, DE LA CRUZ L L, VIDAL M V A, et al. Three new *Tesintes* (*Zea* spp., poaceae) from Mexico[J]. American Journal of Botany, 2011, 98(9): 1537-1548.
- [11] KOTHEA L, WARD S M, CARNEY S E. Assessing the threat from hybridization to the rare endemic *Physalis beffli* Mulligan (Brassicaceae)[J]. Biological Conservation, 2007, 140(1/2): 110-118.
- [12] CLAY D L, NOVAK S J, SERPE M D, et al. Homoploid hybrid speciation in a rare endemic *Castilleja* from Idaho (*Castilleja christii*, Orobanchaceae)[J]. American Journal of Botany, 2012, 99(12): 1976-1990.
- [13] 葛颂,洪德元.遗传多样性及其检测方法[M].北京:中国科学技术出版社,1994:123-140.
- [14] 罗建勋,顾万春.云杉表型与同工酶遗传多样性研究进展[J].林业科学研究,2004(2):255-262.
- [15] 赵永亮,张长付,覃晓娟.金银花的过氧化物酶和淀粉酶同工酶遗传多样性研究[J].安徽农业科学,2008(15):6225-6227.
- [16] 孙彩云,张明永,梁承邨,等.墨兰、春兰变种和品种间同工酶分析[J].园艺学报,2002(1):75-77.
- [17] AKAGI H, YOKOZEKI Y, INAGAKI A, et al. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93(7): 1071-1077.
- [18] MASCHINSKI J, SIRKIN E, FANT J. Using genetic and morphological analysis to distinguish endangered taxa from their hybrids with the cultivated exotic pest plant *Lantana strigocamara* (syn: *Lantana camara*)[J]. Conservation Genetics, 2010, 11(5): 1607-1621.
- [19] ELANSARY H O M, ADAMEC L, STORCHOVA H. Uniformity of organellar DNA in *Aldrovanda vesiculosa*, an endangered aquatic carnivorous species, distributed across four continents[J]. Aquatic Botany, 2010, 92(3): 214-220.
- [20] HOLDEREGGER R, ANGELONE S, BRODBECK S, et al. Application of genetic markers to the discrimination of European Black Poplar (*Populus nigra*) from American Black Poplar (*P. deltoides*) and Hybrid Poplars (*P. x canadensis*) in Switzerland[J]. Trees-Structure and Function, 2005, 19(6): 742-747.
- [21] MACHON N, GUILLON J M, DOBIGNY G, et al. Genetic variation in the horsetail *Equisetum variegatum* Schleich, an endangered species in the Parisian region[J]. Biodiversity and Conservation, 2001, 10(9): 1543-1554.

- [22] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(10): 4127–4138.
- [23] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6531–6535.
- [24] 黄绍辉, 方炎明. 濒危植物连香树遗传多样性研究[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2011(3): 65–69.
- [25] MORDEN C W, HIRAMOTO T, YORKSTON M. Genetic diversification among populations of the endangered Hawaiian endemic *Euphorbia kuwaleana* (Euphorbiaceae) [J]. *Pacific Science*, 2014, 68(1): 75–83.
- [26] 高燕会, 樊民亮, 骆文坚, 等. 濒危树种金钱松 RAPD 体系的建立和遗传多样性分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2011(5): 815–822.
- [27] 周则刚, 方炎明, 王标. 米心水青冈基因组 DNA 提取及 RAPD 反应体系优化[J]. *植物研究*, 2008(6): 684–688.
- [28] ALBERTO D H, LOPEZ-PUJOL J, CHUNG M Y, et al. Population genetics and conservation of the extremely narrow *Pyrenean palaeoendemic* *Glandora oleifolia* (Boraginaceae) [J]. *Plant Ecology & Diversity*, 2012, 5(4): 501–511.
- [29] 韩凡, 邹嘉欣, 宋良科, 等. 峨眉黄连及其近缘种的遗传多样性分析[J]. *安徽农业科学*, 2012(30): 14648–14650.
- [30] 王中生, 安树青, 冷欣, 等. 岛屿植物舟山新木姜子居群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *生态学报*, 2004(3): 414–422.
- [31] 焦培培, 张玲, 雍晓鹏, 等. 小沙冬青遗传多样性的 RAPD 分析 [R]. 2013: 1.
- [32] 汪琼, 姚青菊, 徐增荣, 等. 基于 ISSR 和 RAPD 标记的四个夏蜡梅种群的遗传多样性研究[J]. *广西植物*, 2013(1): 30–34, 142.
- [33] 侯茜, 雷英, 刘丽莎, 等. 西部地区濒危药用植物秦艽遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *中华中医药杂志*, 2013(1): 214–216.
- [34] 陈冬立, 宝力德, 杜建材, 等. 31 份苜蓿种质材料的遗传多样性及亲缘关系分析[J]. *中国草地学报*, 2013(2): 19–23.
- [35] 刘曙娜, 于林清, 周延林, 等. 利用 RAPD 技术构建四倍体苜蓿遗传连锁图谱[J]. *草业学报*, 2012(1): 170–175.
- [36] 王晓娟, 班霆, 韩鹏, 等. 基于 RAPD 的群体标记法分析苜蓿种质遗传多样性[J]. *植物研究*, 2010(1): 87–91.
- [37] 苏建荣, 缪迎春, 张志钧. 云南红豆杉紫杉醇含量变异及其相关的 RAPD 分子标记[J]. *林业科学*, 2009(7): 16–20.
- [38] 茹文明, 秦永燕, 张桂萍, 等. 濒危植物南方红豆杉遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *植物研究*, 2008(6): 698–704.
- [39] 张宏意, 陈月琴, 廖文波. 南方红豆杉不同居群遗传多样性的 RAPD 研究[J]. *西北植物学报*, 2003(11): 1993–1996.
- [40] 郑超, 别庆铃, 夏冰, 等. 4 种红豆杉属植物遗传多样性和遗传关系的 RAPD 分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2013(3): 58–62.
- [41] 詹鹏, 徐万吉, 陈介南, 等. 小溪国家级自然保护区落叶木莲生长与遗传多样性分析[J]. *湖南林业科技*, 2013(1): 57–60.
- [42] 代文娟, 黎乾坤, 骆文华, 等. 狭叶坡垒迁地保护种群的 RAPD 多样性分析[J]. *江苏农业科学*, 2013(11): 39–41.
- [43] 时明芝, 宋会兴. 植物遗传多样性研究方法概述[J]. *世界林业研究*, 2005(5): 29–33.
- [44] 王东升, 辛红, 邢世岩, 等. 山东省紫椴遗传多样性 AFLP 分析[J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2014(1): 44–48.
- [45] KITNER M, PRAUSOVA R, ADAMEC L. Present status of genetic diversity of *Potamogeton praelongus* populations in the Czech Republic [J]. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 2013, 53(1): 73–86.
- [46] CIRES E, CUESTA C, FERNANDEZ PRIETO J. A. Genetic diversity and structure in fragmented populations of the endangered species *Ranunculus cabrerensis* (Ranunculaceae): implications for conservation [J]. *Biologia*, 2013, 68(1): 30–40.
- [47] LI Y Y, GUAN S M, YANG S Z, et al. Genetic decline and inbreeding depression in an extremely rare tree [J]. *Conservation Genetics*, 2012, 13(2): 343–347.
- [48] 钱鑫, 李全健, 连静静, 等. 濒危植物扇脉杓兰野生居群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *生态学杂志*, 2013(6): 1445–1450.
- [49] 李晓楠, 狄晓艳, 王孟本. 华北落叶松 AFLP 反应体系的建立和优化[J]. *安徽农业科学*, 2011(2): 697–700.
- [50] SENIOR M L, MURPHY J P, GOODMAN M M, et al. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system [J]. *Crop Science*, 1998, 38(4): 1088–1098.
- [51] 张悦, 易雪梅, 姬兰柱. 从属相关物种筛选红松微卫星标记及其种群遗传多样性分析[J]. *生态学杂志*, 2013(9): 2307–2313.
- [52] 黄海燕, 杜红岩, 乌云塔娜, 等. 基于 SSR 分子标记的杜仲遗传多样性体系建立[J]. *林业科学研究*, 2013(6): 795–799.
- [53] 覃瑞, 赖娟娟, 李作洲, 等. 适用于野生软枣猕猴桃遗传多样性分析的 SSR 引物筛选[J]. *中南民族大学学报: 自然科学版*, 2013(4): 28–32.
- [54] 商韬, 王贤荣, 南程慧, 等. 基于 SSR 标记的迎春樱自然居群遗传多样性分析[J]. *甘肃农业大学学报*, 2013(6): 104–109, 115.
- [55] ZHAO X, MA Y, SUN W, et al. High genetic diversity and low differentiation of *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic in Southeast Yunnan, China [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(4): 4396–4411.
- [56] 傅大立, 李炳仁, 傅建敏, 等. 中国杏属一新种[J]. *植物研究*, 2010(1): 1–3.
- [57] 秦玥, 刘梦培, 傅大立, 等. 华仁杏 SSR 标记的筛选与评价[J]. *经济林研究*, 2013(3): 72–76.
- [58] 周惠娟, 赵鹏, 刘占林. 濒危植物白皮松遗传多样性及遗传结构研究 [R]. 2013: 1.
- [59] 徐敏, 吴生, 刘小霞, 等. 秦岭地区华中五味子 SSR 遗传多样性分析[J]. *中药材*, 2013(8): 1215–1218.
- [60] GARG K, GREEN P, NICKERSON D. A. Identification of candidate coding region single nucleotide polymorphisms in 165 human genes using assembled expressed sequence tags [J]. *Genome Research*, 1999, 9(11): 1087–1092.
- [61] 杨昭庆, 洪坤学. 单核苷酸多态性的研究进展[J]. *国外医学·遗传学分册*, 2000(1): 4–8.
- [62] 唐棣, 王志民. SNPs 检测方法研究进展[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2007(4): 405–418.
- [63] YING S Y, LIN S L. Intron-derived microRNAs-fine tuning of gene functions [J]. *Gene*, 2004, 342(1): 25–28.
- [64] 张传福, 景蕊莲, 张改生, 等. 单核苷酸多态性在植物研究中的应用[J]. *植物遗传资源学报*, 2004(3): 304–308.
- [65] LANDER E S. The new genomics: global views of biology [J]. *Science*, 1996(274): 536.
- [66] YING S Y, LIN S L. MicroRNA: Fine-tunes the function of genes in zebrafish [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 335(1): 1–4.
- [67] 王佳媛, 吴传芳, 唐亚. 基于 SNP 分子标记的凹叶木兰遗传多样性初步研究[J]. *广西植物*, 2012(4): 542–547.
- [68] 何亚平, 刘建全. 植物繁育系统研究的最新进展和评述[J]. *植物生态学报*, 2003(2): 151–163.
- [69] 文亚峰, 韩文军, 吴顺. 植物遗传多样性及其影响因素[J]. *中南林业科技大学学报*, 2010(12): 80–87.
- [70] HAMRICK J L, MURAWSKI D A, NASON J D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic-structure of tropical tree populations [J]. *Vegetatio*, 1993, 108: 281–297.
- [71] MULLER G. Cross-fertilization in a conifer stand inferred from enzyme gene-markers in seeds [J]. *Silvae Genetica*, 1977, 26(5/6): 223–226.
- [72] SLATKIN M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. *Science*, 1987, 236(4803): 787–792.
- [73] NEVO E. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(11): 6233–6240.
- [74] 徐刚标. 植物群体遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [75] LANDE R. Genetics and demography in biological conservation [J]. *Science*, 1988, 241(4872): 1455–1460.
- [76] QIAN X, WANG C X, TIAN M. Genetic diversity and population differentiation of *calanthe tsoongiana*, a rare and endemic orchid in China [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(10): 20399–20413.