

湖北野生春兰资源遗传多样性的ISSR分析

高 丽^{1,2} 杨 波^{1*}

1 (中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

2 (中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 近年来, 由于过度采挖和生境片段化, 湖北野生春兰 (*Cymbidium goeringii*) 资源正面临着灭绝的危险。本文采用ISSR分子标记技术对湖北省内的11个春兰野生居群共325个个体的遗传多样性水平及居群遗传结构进行了研究。11个引物共检测到127个位点, 其中112个为多态位点, 占88.19%。POPGENE分析结果表明: 与其他兰科植物相比, 春兰具有丰富的遗传变异(在物种水平上, $H_e=0.2628$, $H_o=0.4037$; 在居群水平上, $PPL=63.06\%$, $H_e=0.1945$, $H_o=0.2958$)。Nei's遗传多样性分析和AMOVA分析表明, 各居群间产生了一定程度的遗传分化($G_{ST}=0.2440$, $F_{ST}=0.2207$)。居群间一定程度的遗传分化可能是由生境破坏和基因流障碍($N_m=0.8828$)引起。UPGMA聚类分析可知, 与其他居群相比, 恩施地区的5个居群, 即巴东(BD)、福宝山(FBS)、宣恩(XE)、毛坝(MB)、来凤(LF)优先聚成一支, 而大悟(DW)居群单独聚为一支。同时本研究也表明, 虽然春兰自交亲和, 但在自然界中其繁育系统还是以异交为主。鉴于春兰资源的遗传多样性现状和其相应的居群遗传结构, 我们建议在遗传多样性较高的来凤(LF)、京山(JS)、大悟(DW)居群设立保护点进行就地保护; 而对资源破坏最为严重的毛坝(MB)和宣恩(XE)居群要实行迁地保护。

关键词: *Cymbidium goeringii*, 野生资源, 居群遗传结构, 保护

Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis

Li Gao^{1,2}, Bo Yang^{1*}

1 Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074

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

Abstract: Wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) plants in Hubei Province have become endangered due to over-harvesting and habitat fragmentation in recent years. The genetic diversity of 325 individuals from 11 populations in Hubei Province was investigated using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. As a result, 127 bands were amplified by 11 informative and reliable primers, of which 112 were polymorphic loci. A relatively high level of genetic diversity was revealed: $PPL=88.19\%$, $H_e = 0.2628$, $H_o = 0.4037$ (at species level); $PPL = 63.06\%$, $H_e = 0.1945$, $H_o = 0.2958$ (at population level). A higher level of genetic differentiation was detected among populations with Nei's G_{ST} analysis and analysis of molecular variance (AMOVA; $G_{ST} = 0.2440$, $F_{ST} = 0.2207$). Some differentiation may result from habitat fragmentation and barriers to gene flow. UPGMA cluster analysis indicated that the five populations from Enshi region (BD, FBS, XE, MB, and LF) grouped together, whereas Dawu (DW) population clustered in an isolated clade. The Mantel test showed that genetic distance was positively correlated with geographical distance. Furthermore, the results showed that a mixed mating system was possibly the main factor influencing the genetic structure of this species. These results, combined with other information about *C. goeringii*, may provide a valuable basis for proposing conservation strategies. *In situ* conservation will be suitable for Laifeng (LF), Jingshan (JS), and Dawu (DW) populations with sufficient genetic diversity, while an *ex situ* strategy should be taken into considera-

tion for Maoba and Xuanen populations, where only a few individuals are left.

Key words: *Cymbidium goeringii*, wild resource, population genetic structure, conservation

春兰(*Cymbidium goeringii*)为兰科兰属多年生地生植物, 分布于我国陕西南部、甘肃南部、江苏、安徽、浙江、江西、福建、台湾、河南南部、湖北、湖南、广东、广西、四川、贵州、云南, 生于湿润砾石山坡、林缘和灌丛草坡等, 分布海拔约300–2,200 m, 在台湾可达到3,000 m。春兰在我国有悠久的栽培历史, 是我国兰属植物中分布最广、资源最丰富、选育园艺品种最多的种类之一, 具有很高的观赏价值和经济价值。

兰科植物多为珍稀濒危植物, 全世界所有野生兰科植物均被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护范围, 占该公约应保护植物的90%以上。随着兰花市场的不断扩大, 在利益的驱动下, 人们对野生兰花资源的过度开采, 使兰花的自然生境和野生资源遭到了严重的破坏。此外, 因为兰科植物种子极为细小且不具胚乳, 没有营养物质供发芽之用, 生长发育完全依赖共生真菌提供营养; 种子成熟后保持发芽力的时间又很短, 所以在自然状态下自我繁殖能力较低, 并且其对生长环境的要求较为苛刻, 因此若盲目开采, 很容易造成物种的灭绝(郭保香和廖明尧, 2003)。

湖北地区位于华中腹地, 处于中国植物区系的核心部分, 东西渗透, 是中国具有东亚特色的生物多样性最丰富的地区之一。湖北省兰花资源极为丰富, 尤其是兰属植物中的春兰和蕙兰(*Cymbidium faberi*) 极具特色, 因此也成为野生兰花资源遭受破坏的重灾区, 对其加强保护使其能可持续利用迫在眉睫。

近年来, 虽然人们已逐渐认识到保护兰科植物的重要意义, 并开展了初步的保护生物学研究和对兰科一些重要物种的保护工作, 但大多数保护活动仍然是在缺乏基本的生物学研究尤其是保护遗传学研究的情况下进行的(Li *et al.*, 2002), 很难制定科学合理的保护和抢救措施。虽然欧美和澳大利亚已对野生兰科植物开展了一些保护遗传学研究(Case *et al.*, 1998; Ackerman & Ward, 1999; Borba *et al.*, 1999; Ehlers & Pedersen, 2000), 但涉及种类不多。我国目前关于兰科植物的研究主要集中在形态

学、分类学、生理学、孢粉学、区系地理学和繁殖生物学等方面(陈心启和罗毅波, 2003), 而关于居群遗传学的研究则很少(Li *et al.*, 2002), 并且对兰科植物遗传多样性和居群遗传结构的研究绝大多数是采用等位酶的方法进行(Ackerman & Word, 1999; Ehler & Pedersen, 2000), 而采用RAPD和ISSR技术的报道则很少(Wong & Sun, 1999; Li *et al.*, 2002)。

近年来, 应用ISSR技术对植物进行遗传多样性研究已有较多报道(Gilbert *et al.*, 1999; Prevost & Wilkinson, 1999; 钱韦等, 2000; Camacho & Liston, 2001; Xue *et al.*, 2004), 而采用ISSR技术对野生春兰的遗传多样性和居群遗传结构进行的研究目前尚少有报道。本研究采用ISSR分子标记技术对湖北省分布的野生春兰居群进行了研究, 探讨其居群遗传多样性水平和遗传结构, 为科学合理地保护和利用现有的野生春兰资源提供理论依据和技术支持。

1 材料和方法

1.1 植物材料

研究材料采集于湖北的京山、大悟、房县、随州、通山、阳新、恩施等地(图1), 共计11个居群, 325个样本。调查过程中, 对于个体数大于30株的居群就按照均匀分布、随机取样的原则进行采样, 而对于个体数少于此数的居群进行全部个体采样。采集新鲜叶片, 记录各居群的生境、海拔、经纬度(表1), 所有样本均在中国科学院武汉植物园进行迁地保存。

1.2 基因组DNA提取

采用改良的CTAB法(Doyle & Doyle, 1987)提取基因组DNA, 用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 并在紫外分光光度计(Brim-IOA-0004)下检测其浓度, 最后稀释标定到10 ng/μL, 放入–20℃冰箱里储存备用。

1.3 引物筛选与PCR扩增

所用引物参照加拿大哥伦比亚大学UBC公司公布的第9套ISSR引物序列(<http://www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers/Primers.pdf>), 由上海博亚生物技术有限公司合成。每个居群各选取2个DNA模

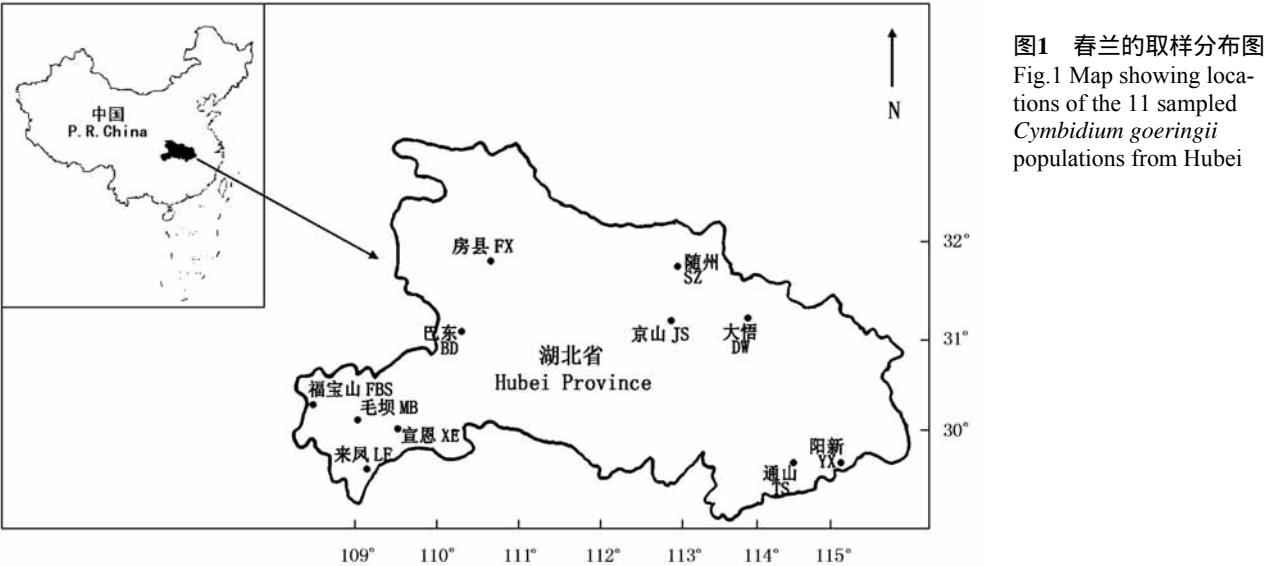


表1 湖北野生春兰取样居群分布的生境、海拔、经纬度及采样数
Table 1 Habitat, altitude, longitude, latitude, and sample size of *Cymbidium goeringii* populations from Hubei

居群 Population	生境 Habitat	海拔 Altitude(m)	经度 Longitude	纬度 Latitude	采样数 Sample size
京山 JS	松树与栎树混交林 Mixed forest of pine and robur	400	113°09' E	31°17'N	32
大悟 DW	松树林 Pine forest	110	114°06' E	31°24' N	31
房县 FX	栎树林 Robur forest	1,340	110°37' E	31°52' N	42
随州 SZ	松树林 Pine forest	360	113°06' E	31°48' N	41
通山 TS	竹林 Bamboo forest	190	114°36' E	29°44' N	48
阳新 YX	松树与栎树混交林 Mixed forest of pine and robur	200	115°18' E	29°45' N	50
福宝山 FBS	松树与栎树混交林 Mixed forest of pine and robur	1,000	108°27' E	30°13' N	20
巴东 BD	松树林 Pine forest	983	110°16' E	31°01' N	15
来凤 LF	松树与栎树混交林 Mixed forest of pine and robur	759	109°23' E	29°30' N	26
宣恩 XE	松树与栎树混交林 Mixed forest of pine and robur	860	109°30' E	30°01' N	12
毛坝 MB	松树与栎树混交林 Mixed forest of pine and robur	794	109°03' E	30°02' N	8

板在15 μ L的反应体系中进行扩增筛选, 从70个引物中选取了11条扩增条带清晰、重复性好的引物(表2)用于全部11个居群样本分析。

PCR 扩 增 反 应 在 PTC-200(MJ Research, USA)PCR仪上进行, 经过比较和优化确定最佳的 ISSR扩增条件为15 μ L的反应体系, 内含1 \times Buffer,

0.2 mmol/L dNTPs (Takara Biotec.), 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 μ mol/L 引物, 0.3 U *Taq* DNA聚合酶 (Fermentas, Lithuania), 20 ng模板DNA。PCR扩增程序为94 预变性2.5 min; 之后进行35个循环: 94 变性45 s, 48–58 退火 (退火温度随引物而定, 见表2) 45 s, 72 延伸2 min; 循环结束后72 延伸5

min。

1.4 产物检测

扩增产物用1.0×TBE配制的1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 在240 V电压下电泳1 h, Marker用100 bp DNA ladder (Takara Biotec.)。电泳结束后在凝胶成像系统(Alpha Innotech Corporation)中观察、记录、保存图像。

1.5 数据统计分析

按照电泳图谱中同一位置上DNA带的有无进行统计, 有带的记为“1”, 无带的记为“0”, 仅记录清晰、稳定且长度在300–1,100 bp范围内的扩增带, 形成 0/1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE 1.31(Yeh *et al.*, 1999) 软件在假定种群处于 Hardy-Weinberg平衡状态下, 对全部居群和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(PPL)、观测等位基因数(A_o)、有效等位基因数(A_e)、Nei's(1973)基因多样性指数(H_e)、Shannon 信息指数(H_o)、群体总基因多样性(H_t)、群体内基因多样性(H_s)、群体间的遗传分化系数(G_{ST})、Nei's(1978)遗传距离(D)和遗传一致度(I)。根据Nei's遗传距离, 利用NTSYS-pc 2.1(Rohlf, 2000)软件对居群进行UPGMA聚类分析。采用ARLEQUIN 2.0(Schneider *et al.*, 2000)软件对居群间和居群内的遗传变异进行分子变异分析(AMOVA)。另外, 研究还进一步利用TFPGA(Miller, 1997)软件对Nei's无偏差预期杂合度(h)(Nei, 1978)和Wright的基因分化系数(Φ_{ST})(Weir & Cockerham, 1984)进行了统计计算; 居群间的基因流通过公式 $N_m = (1-F_{ST})/4F_{ST}$ 间

接推算。

2 结果

2.1 物种和群体水平的遗传多样性

11条引物共检测到127个位点(每条引物产生9–16个位点), 其中112个位点是多态的。在物种水平上, 多态位点百分率为88.19%, Nei's基因多样性指数(H_e)为0.2628, Shannon信息指数(H_o)为0.4037。居群水平上的多态位点百分率在42.52–75.59%之间, 平均为63.06%, 最高的是京山(JS)和通山(TS)居群, 最低的是毛坝(MB)居群。居群的Nei's基因多样性指数在0.1500–0.2355之间, 平均为0.1945; Shannon信息指数在0.2245–0.3568之间, 平均为0.2958, 两者大小与居群多态位点百分率的大小趋势基本一致(表3)。

2.2 居群间遗传分化程度的比较分析

POPGENE分析结果表明, 居群间遗传分化系数(G_{ST})为0.2440, 表明居群间具有一定水平的遗传分化。AMOVA分析结果进一步表明了类似的情况(表4), 居群间的遗传变异占总遗传变异的22.07% ($P < 0.001$)。另外, 用TFPGA计算Wright的基因分化系数 $\Phi_{ST} = 0.2296$, 此结果与用POPGENE、AMOVA进行分析的结果相一致。其中毛坝居群和来凤居群间的遗传分化系数最低, 福宝山居群和巴东居群间的遗传分化系数最高。根据公式 $N_m = (1-F_{ST})/4F_{ST}$ 计算居群间的基因流 $N_m = 0.8828$ 。

2.3 聚类分析

根据Nei's遗传距离(D)和遗传一致度(I), 用

表2 对春兰11个居群325个个体进行扩增的ISSR引物
Table 2 ISSR primers used for generating ISSR markers from 325 individuals of 11 *Cymbidium goeringii* populations

引物 Primer	序列(5'—3') Sequence	退火温度() Annealing temperature	统计位点数 No. of bands scored	多态位点数 No. of polymorphic bands
807	(AG) ₈ T	52.3	16	16
811	(GA) ₈ C	48.0	14	13
812	(GA) ₈ A	54.0	13	13
817	(CA) ₈ A	52.3	9	7
818	(CA) ₈ G	54.0	13	10
825	(AC) ₈ T	50.8	9	8
827	(AC) ₈ G	50.8	10	9
829	(TG) ₈ C	58.0	11	10
834	(AG) ₈ YT	55.4	10	9
835	(AG) ₈ YC	48.0	9	7
840	(GA) ₈ YT	48.0	13	10

Y=(C,T)

表3 春兰居群的遗传多样性
Table 3 Genetic diversity of *Cymbidium goeringii* populations

居群 Population	观测等位 基因数 A_o	有效等位 基因数 A_e	Nei's基因多 样性 H_e	Shannon信 息指数 H_o	多态位点 百分率 $PPL(\%)$
京山 JS	1.7559	1.3643	0.2186	0.3363	75.59
大悟 DW	1.7087	1.3492	0.2095	0.3206	70.87
房县 FX	1.5906	1.2913	0.1740	0.2653	59.06
随州 SZ	1.6772	1.3124	0.1892	0.2920	67.72
通山 TS	1.7559	1.4002	0.2355	0.3568	75.59
阳新 YX	1.7323	1.3958	0.2334	0.3528	73.23
福宝山 FBS	1.5984	1.3275	0.1943	0.2940	59.84
巴东 BD	1.5276	1.2830	0.1678	0.2548	52.76
来凤 LF	1.6850	1.3555	0.2116	0.3220	68.50
宣恩 XE	1.4803	1.2579	0.1546	0.2350	48.03
毛坝 MB	1.4252	1.2617	0.1508	0.2245	42.52
居群水平 Population level	1.6306	1.3272	0.1945	0.2958	63.06
物种水平 Species level	1.8819	1.4325	0.2628	0.4037	88.19

A_o , Observed number of alleles; A_e , Effective number of alleles; H_e , Nei's gene diversity; H_o , Shannon's information index; PPL , Percentage of polymorphic loci.

表4 居群间和居群内分子变异的AMOVA分析结果
Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	变异组分 Variance component	总变异百分率(%) Percentage of total variance	P^*
居群间 Among populations	10	4.05732	22.07	<0.001
居群内 Within population	314	14.33094	77.93	<0.001
总计 Total	324	18.38827		

* P 值表示比观察值的变异大的概率，这个概率是通过把居群中的样本经过1,023次随机排列改变计算得到的
* P -values are the probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone. Probabilities were calculated by 1,023 random permutations of individuals across populations.

NTSYS-pc 2.1对11个居群进行UPGMA聚类分析的结果见图2。从图中可以看出，房县(FX)居群和随州(SZ)居群的遗传距离最近，首先聚在一起；恩施地区的5个居群（巴东（BD）、福宝山（FBS）、宣恩（XE）、毛坝（MB）、来凤（LF））在与其他居群相聚之前优先聚为一支；而大悟(DW)居群与其他各居群的遗传距离均较大，最后才与其他居群聚类。为研究距离对春兰遗传结构的影响，我们对各居群间的地理距离和遗传距离进行了Mantel检验，结果表明，居群间的地理距离和遗传距离之间没有显著相关性($r = 0.25093$, $P = 0.9704$)。

3 讨论

3.1 春兰的遗传多样性

与其他兰科植物在RAPD水平上的遗传多样性

相比，春兰的遗传多样性($PPL = 88.19\%$, $H_e = 0.2628$)比高斑叶兰 (*Goodyera procera*) ($PPL = 97\%$, $H_e = 0.293$) (Wong & Sun, 1999)稍低，而高于硬叶兜兰 (*Paphiopedilum micranthum*) ($PPL = 71.6\%$, $H_e = 0.217$) (Li *et al.*, 2002)、麻栗坡兜兰 (*Paphiopedilum malipoense*) ($PPL = 49.5\%$, $H_e = 0.1174$) (Li *et al.*, 2002)、独花兰 (*Changnienia amoena*) ($PPL = 76.5\%$, $H_e = 0.1941$) (Li *et al.*, 2002)。由此可以看出，春兰的遗传多样性整体水平还是比较高的。

一般而言，广布种比狭域分布的物种具有更高的遗传多样性(Hamrick *et al.*, 1991)。春兰为多年生草本地生植物，广泛分布于我国大部分地区，日本和朝鲜也有。春兰丰富的遗传多样性与其能依靠假鳞茎行无性繁殖有关。有性繁殖可以产生杂合的子

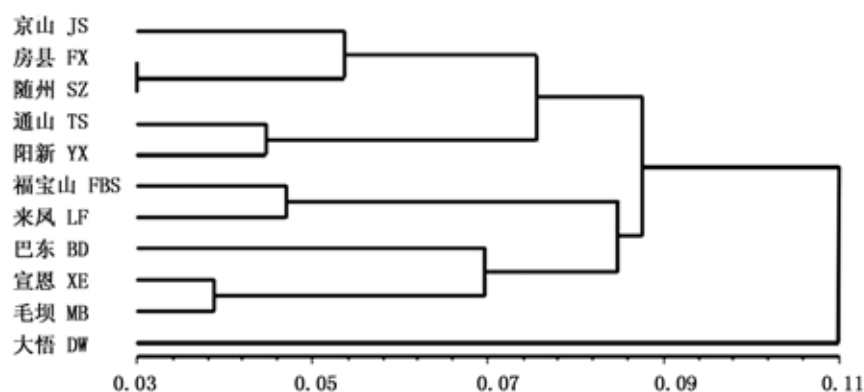


图2 居群间Nei's遗传距离的UPGMA聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram for 11 *Cymbidium goeringii* populations based on Nei's genetic distance

代, 再通过杂合个体的无性繁殖将这些杂合基因位点固定下来并维持其丰富的遗传多样性。形态多样性是遗传多样性的表现形式之一。春兰的形态性状表现出极高的多样性, 从植株高矮到叶色、叶形、花色、瓣形等都表现出很大变异, 这些变异表现在不同的“艺”上, 如“叶艺”、“花艺”等, 特别是花的唇瓣变异最大, 且这些变异不仅存在于居群间而且存在于居群内。

遗传变异的产生原因是多方面的, 诸如有性生殖、体细胞突变、选择、基因流、遗传漂变及环境的影响。春兰是兼性生殖, 异花授粉产生新的基因组合, 但是其种子在自然条件下发芽率很低, 成苗更难, 因此有性生殖的几率很小, 但它仍是产生遗传变异的主要因素。高等植物的体细胞突变是很普遍的, 在有性生殖非常缺乏的植物中, 体细胞突变可能是主导遗传变异的一个主要因素(康明和黄宏文, 2002), 因此我们推测体细胞突变可能是增加春兰遗传多样性的一个因素之一。

湖北春兰居群间的生境差异较大, 海拔从190–1,400 m, 随着海拔的升高, 气候、植被、土壤等也呈现明显的垂直变化, 因而造成11个居群间的遗传多样性水平也存在较大差异。其中, 毛坝(MB)居群的遗传多样性水平最低, 这可能与样本数量较少、生境片段化有关。野外调查时毛坝(MB)居群的资源破坏最为严重, 只采集到8个样本。京山(JS)居群和通山(TS)居群因生境较为复杂、样本数量较多, 因而具有相对较高的居群遗传多样性水平。

3.2 春兰居群的遗传分化与基因流

Bussell (1999)曾对35个物种的RAPD分析结果

进行了总结, 发现29个远交物种的居群间变异在总遗传变异中平均占19.3%($G_{ST}=0.193$), 而6个近交物种的平均 G_{ST} 为0.625。尽管目前还缺乏春兰繁育生物学方面的确切证据, 但一般认为它为远交物种。本研究中春兰的居群间遗传分化程度($G_{ST} = 0.2440$)显然远低于近交物种的水平, 而高于远交物种的平均值。春兰的这种遗传结构也进一步证明了它是以异交为主的混交类群。Hogbin和Peakall(1999)以及Wong和Sun(1999)的研究均表明, RAPD所揭示的群体遗传结构式样与等位酶很相似。由此, 与其他远交物种的平均遗传分化程度($G_{ST} = 0.144$)(Bussell, 1999)相比, 春兰的遗传分化程度较高, 且高于一些同样靠风力传播种子的兰科植物, 如红门兰属的*Orchis palustris*($G_{ST}=0.17$)(Scacchi *et al.*, 1990)和杓兰属的*Cypripedium calceolus*($G_{ST} = 0.19$)(Case, 1993)。

影响居群间遗传结构的因素很多, 如繁育系统、分布范围、花粉和种子传播机制等。春兰的这种遗传结构的形成可能有以下几方面的原因:

(1) 植物居群间的基因流是借助于花粉、种子、孢子、植株个体以及其他携带遗传物质的物体为媒介进行的, 其中花粉和种子扩散是自然植物种群最主要的基因流(李海生和陈桂珠, 2004)。春兰种子即便可以借助风和水传播较远距离, 但是要跨越至少几十公里的地理阻隔仍然很困难, 而且种子在长距离的传播过程中也可能已经丧失了活力, 即使在适宜的环境中如果没有某种真菌的帮助也还是不能萌发, 因此空间隔离和缺乏有效新个体的迁入是造成居群间遗传分化的一个原因。另外, 春

兰主要靠飞行能力弱的昆虫(蜂、蝇等)传粉,且居群间的地理距离(最小为42.798 km)普遍较大,因而阻碍了居群间的基因交流。在聚类图中(图2),每个居群的个体各自聚在一起,只有个别个体与其他居群聚在一起,也说明了这一点。

(2) 根据我们的野外调查和统计,春兰的生境正受到严重的人为干扰,大部分春兰居群的规模很小,个体在居群中零星分布,同时人为的采集又加剧了这一过程,因此由于滥采滥挖、毁林开荒等原因导致兰花适宜生存的生境不断萎缩和退化及其生境片段化也是导致居群间产生较大遗传分化的一个重要原因。

(3) 春兰居群间的基因流为0.8828。Slatkin (1985)认为,当 $N_m < 1$ 时,基因流就不足以抵制居群内因遗传漂变而引起的居群分化。因此遗传漂变也可能成为形成春兰居群间较大遗传分化的因素。

Mantel检验结果表明,春兰居群的遗传距离与地理距离之间没有显著相关性。居群UPGMA聚类分析结果(图2)表明:随州(SZ)居群和房县(FX)居群的遗传距离最近,首先聚在一起,实际上随州与房县相距二百多公里而与京山(JS)相距仅五十多公里,这反映了遗传距离和地理距离之间不呈显著相关。恩施地区的5个居群聚在一起,而与其他居群分开,这反映了遗传距离与地理距离之间又存在一定的相关性;同时也与恩施独特的地理特征和气候类型有关:恩施位于鄂西南山区中部,地势四周高中间低,属亚热带季风性湿润气候,降雨充沛、终年湿润、雨热同期,这也是造成恩施居群有别于其他地方居群的一个重要原因。

另外,从聚类图中还可以看出,大悟(DW)居群单独成为一支并处于整个分支的外围。尽管大悟(DW)居群与其他居群的生境相比并无特别之处,但很明显大悟(DW)居群与其他居群的遗传距离较大,与其他居群的遗传分化程度也较高,这是否是由大别山区独特的生态因子所导致,还是由于其他因素或机制的影响,还有待于进一步研究探讨。

3.3 野生春兰资源的保护

物种的遗传多样性水平在一定程度上体现着这个物种适应环境的能力,制约着物种适应性进化的水平,同时物种的遗传多样性水平可以为其现状和保护价值的评估以及迁地保护提供非常重要的

信息(Hogbin & Peakall, 1999; Bawa & Ashton, 1991; Hamrick & Godt, 1996)。本研究结果表明,春兰的遗传多样性水平较高,居群间形成了一定程度的遗传分化,因此我们推测野生春兰资源遭受严重破坏的原因主要是最近的人为滥采滥挖造成的生境破坏和居群片段化。针对这种现状结合其遗传多样性及遗传结构特点,我们提出了以下几点保护策略: (1) 遗传多样性较高的来凤(LF)、京山(JS)、大悟(DW)居群破坏较为严重,野生资源已所剩无几并且很难见到幼苗,因此对这些地方的保护显得尤为紧迫。建议在这三个地区建立自然保护区、保护小区或保护点,加强其原生境的保护,禁止滥采滥挖。由于这些居群的遗传基础较好,若采取有效的保护,居群是可以维持自然更新的。(2) 在生境破坏严重或受到过大的商业采集压力的地区,迁地保护是其唯一可行的保护措施。毛坝(MB)、宣恩(XE)居群由于采挖现象特别严重,分布区内仅见少量的幼苗零星散生,甚至还看到采挖后被遗弃的春兰植株,因此对这两个居群的保护只能采取迁地保护策略。同时,对这两个地区的生境也应该采取必要的保护,比如进行定期的封山,促进其幼苗更新和野生居群的恢复。(3) 鉴于房县(FX)居群的资源相对丰富而遗传基础相对薄弱,可以考虑设立一些保护点同时作为迁地保护基地,适当地引进京山(JS)、大悟(DW)等居群的个体或后代以增加其遗传多样性。

致谢: 本实验在中国科学院武汉植物园植物保育遗传学重点实验室完成,得到实验室全体成员的大力帮助;另外,李作洲博士、姚小洪博士、陈磊博士和刘义飞博士在论文的修改上提出了宝贵的意见,特此致谢!

参考文献

- Ackerman JD, Ward S (1999) Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? *Systematic Botany*, **24**, 282–291.
- Bawa KS, Ashton PS (1991) Conservation of rare trees in tropical rain forests: a genetic perspective. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (eds Falk DA, Holsinger KE), pp. 62–71. Oxford University Press, New York.
- Borba EL, Shepherd GJ, Semir J (1999) Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian ‘campo rupestre’ vegetation. *Plant Systematics and Evolution*, **217**, 205–214.

- Bussell JD (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, **8**, 775–789.
- Camacho FJ, Liston A (2001) Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *American Journal of Botany*, **88**, 1065–1070.
- Case MA (1993) High levels of allozyme variation within *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) and low levels of divergence among its varieties. *Systematic Botany*, **18**, 663–677.
- Case MA, Mlodozienec HT, Wallace LE, Weldy TW (1998) Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky lady's slipper: *Cypripedium kentudkiense* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **85**, 1779–1786.
- Chen SC (陈心启), Luo YB (罗毅波) (2003) Advances in some plant groups in China. I. A retrospect and prospect of Orchidology in China. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **45** (Suppl.), 2–20. (in Chinese with English abstract)
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11–15.
- Ehlers BK, Pedersen H (2000) Genetic variation in three species of *Epipactis* (Orchidaceae): geographic scale and evolutionary inferences. *Biological Journal of the Linnean Society*, **69**, 411–430.
- Gilbert JE, Lewis RB, Wilkinson MJ, Caligari PDS (1999) Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, 1125–1131.
- Guo BX (郭保香), Liao MY (廖明尧) (2003) Study on the wild Arethuse resource protection and development in Shennongjia. *Hubei Forest Science and Technology* (湖北林业科技), (1), 24–27. (in Chinese with English abstract)
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Conservation genetics of endemic plant species. In: *Conservation Genetics: Case Histories from Nature* (eds Avise JC, Hamrick JL), pp. 281–304. Chapman and Hall, New York.
- Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD (1991) Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (eds Falk DA, Holsinger KE), pp. 75–86. Oxford University Press, New York.
- Hogbin PM, Peakall R (1999) Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, **13**, 514–522.
- Kang M (康明), Huang HW (黄宏文) (2002) Allozymic variation and genetic diversity in *Malus hupehensis* (Rosaceae). *Biodiversity Science* (生物多样性), **10**, 376–385. (in Chinese with English abstract)
- Li A, Luo YB, Xiong ZT, Ge S (2002) A preliminary study on conservation genetics of three endangered orchid species. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **44**, 250–252.
- Li HS (李海生), Chen GZ (陈桂珠) (2004) Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan Island based on ISSR analysis. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), **24**, 1656–1662. (in Chinese with English abstract)
- Miller MP (1997) *Tools for Population Genetics Analysis* (TFPGA), Version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **70**, 3321–3323.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, 107–112.
- 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.
- Scacchi R, De Angelis G, Lanzara P (1990) Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridizing aptitude. *Genetica*, **81**, 143–150.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *ARLEQUIN, Version 2.0, A Software for Population Genetics Data Analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 393–430.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Wong KC, Sun M (1999) Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 1406–1413.
- Xue DW, Ge XJ, Hao G, Zhang CQ (2004) High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Primula interjacens* by ISSR analysis. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **46**, 1163–1169.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) *POPGENE Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis*. University of Alberta and Centre for International Forestry Research.

(责任编辑: 葛学军 责任编辑: 时意专)