

极小种群野生植物巴郎山杓兰的 CDDP 遗传多样性分析

杨舒婷¹, 马晓娜¹, 白晓霖¹, 谭凯峰¹, 张傲来¹,
骆娟¹, 白洁¹, 谭迎春², 何廷美²

(1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;
2. 四川卧龙国家级自然保护区管理局, 汶川 623000)

摘 要: 巴郎山杓兰(*Cypripedium palangshanense*)是中国特有的珍稀濒危保护植物,属于狭域分布的极小种群野生植物. 为研究其遗传多样性,采用 CDDP 分子标记技术对卧龙和王朗自然保护区巴郎山杓兰的 2 个野生居群 6 个试验点的 92 份材料进行了遗传多样性评价,并进一步探讨了遗传多样性与环境因子之间的相关性. 遗传分析结果表明,筛选的 12 条引物,在物种水平上,共检测到 131 个位点,多态位点条带百分率(*PPL*)为 100%,观测等位基因(*Na*)为 2.0000,有效等位基因(*Ne*)为 1.5026,Nei's 遗传多样性指数(*H*)为 0.3141,Shannon 多样性指数(*I*)为 0.4856,巴郎山杓兰表现出较高的遗传多样性;在居群水平上,卧龙居群的遗传多样性高于王朗居群,其中,*Na* 的变化范围为 1.4504~1.9160;*Ne* 的变化范围为 1.2446~1.4336;*H* 在 0.1464~0.2679 之间;*I* 在 0.2231~0.4153 之间;*PPL* 的变化范围为 45.04%~91.60%. 巴郎山杓兰的遗传分化系数(*Gst*)为 0.2863,遗传结构和 AMOVA 分析均表明巴郎山杓兰居群间出现了遗传分化. Mantel 检验表明巴郎山杓兰居群之间的遗传距离和地理距离之间有显著的相关性($R^2=0.3830, P<0.05$). UPGMA 聚类分析表明卧龙居群和王朗居群各聚为一支. 遗传多样性与环境因子的相关性分析表明,观测等位基因(*Na*)、多态位点数(*Np*)、多态位点百分率(*PPL*)与速效钾含量(AK)呈显著正相关;有效等位基因数(*Ne*)、Nei's 遗传多样性指数(*H*)和 Shannon 信息指数(*I*)与海拔(Alt)呈显著正相关;其余环境因子与遗传多样性指数之间没有显著相关性. 本研究结果表明 CDDP 分子标记适用于巴郎山杓兰的遗传多样性研究,并且表现出较高的多态性.

关键词: 极小种群;巴郎山杓兰;CDDP 分子标记;遗传多样性;环境因子

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.066002

CDDP genetic diversity analysis of a very small population of wild plant *Cypripedium palangshanense*

YANG Shu-Ting¹, MA Xiao-Na¹, BAI Xiao-Lin¹, TAN Kai-Feng¹,
ZHANG Ao-Lai¹, LUO Juan¹, BAI Jie¹, TAN Ying-Chun², HE Ting-Mei²

(1. Key Laboratory of Bio- Resources and Eco- Enviroment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;
2. Sichuan Wolong National Nature Reserve Administration, Wenchuan 623000, China)

收稿日期: 2022-03-25
基金项目: 卧龙自然保护区巴郎山杓兰资源调查
作者简介: 杨舒婷(1996-),女,四川洪雅人,硕士研究生,研究领域为野生动植物资源保护与利用.
E-mail: 2019222045179@stu.scu.edu.cn
通讯作者: 白洁. E-mail: baijie@scu.edu.cn

Abstract: *Cypripedium palangshanense* is a rare and endangered protected plant unique to China. It is an extremely small population of wild distributed in a narrow area. To study its genetic diversity CDDP molecular marker technology was used to evaluate the genetic diversity of 92 materials from 6 experimental sites in 2 wild populations of *C. palangshanense* in Wolong and Wanglang Nature Reserves, and further explore the relationship between genetic diversity and environmental factors. The results of the genetic analysis showed that a total of 131 locus were detected at the species level with 12 primers, the percentage of polymorphic loci (PPL) was 100%, the observed allele (N_a) was 2, the effective allele (N_e) was 1.5026, the Nei's genetic diversity index (H) was 0.3141, and the Shannon diversity index (I) was 0.4856; At the population level, the genetic diversity of Wolong population was higher than that of Wanglang population, and the variation range of N_a was 1.4504 ~ 1.9160; the variation range of N_e was 1.2446 ~ 1.4336; H was between 0.1464 and 0.2679; I was between 0.2231 and 0.4153; the variation range of PPL was 45.04% ~ 91.60%. The genetic differentiation coefficient (G_{st}) of *C. palangshanense* was 0.2863. The genetic structure and AMOVA analysis showed that there was genetic differentiation among the populations of *C. palangshanense*. Mantel test showed that there was a significant correlation between genetic distance and geographical distance among *Cypripedium palangshanense* populations in Balang mountain ($R^2 = 0.3830$, $P < 0.05$). According to UPGMA cluster analysis, Wolong population and Wanglang population are clustered into one branch. The correlation analysis between genetic diversity and environmental factors showed that there was a significant positive correlation among observed allele (N_a), the number of polymorphic loci (N_p), percentage of polymorphic loci (PPL) and available potassium content (AK); The number of effective alleles (N_e), Nei's genetic diversity index (H) and Shannon information index (I) were significantly positively correlated with altitude (Alt); There was no significant correlation between remaining environmental factors and genetic diversity index. The results showed that CDDP molecular markers technology was suitable for the study of the genetic diversity of *C. palangshanense*, and was highly polymorphic.

Keywords: Extremely small populations; *Cypripedium palangshanense*; CDDP molecular marker technology; Genetic diversity; Environmental factors

1 引言

巴郎山杓兰 (*Cypripedium palangshanense* T. Tang & F. T. Wang) 隶属于兰科 (Orchidaceae) 杓兰属 (*Cypripedium*) 植物, 于 1936 年由唐进和汪发缙在卧龙发现并命名. 巴郎山杓兰是我国特有的 II 级珍稀濒危保护植物, 生长于钙化质的山腰谷壁和次生杂木林荫下, 零星分布在中国四川的卧龙、王朗国家自然保护区的局部生境, 成为狭域分布的极小种群, 目前已被纳入《全国极小种群野生植物拯救保护工程规划》. 极小种群野生植物是在特定条件下形成的, 因数量低于稳定存活的最小数量 (草本植物类群为 10000 株个体) 而成为濒临灭绝的种类^[1]. 然而, 极小种群却是自然生态环境体系中的关键物种, 如果灭绝则不可逆, 甚至可能引起连锁效应破坏生态系统的稳定性^[2,3]. 卧龙自然

保护区是巴郎山杓兰的模式标本采集地, 也是目前巴郎山杓兰分布面积最大 (10000 m²)、数量最多 (不足 500 株) 的区域, 但是近年来由于人为干扰、地质灾害频发等原因, 使得巴郎山杓兰的自然分布区面积急剧缩减, 数量也逐年减少, 引发生存危机.

遗传多样性代表了生物种群内部和种群之间的可遗传变异, 是生物多样性的重要组成部分和基础^[4]. 物种的遗传多样性越丰富, 对环境的适应能力就越强, 进化潜力就越大. 植物的遗传多样性受繁育系统、传粉方式、种子休眠状况等内在因素的影响, 同时也受地理经纬度、气候、土壤等各种外界环境因素的影响. 保守 DNA 衍生多态性 (Conserved DNA-derived Polymorphism, CDDP) 分子标记技术是一种基于 DNA 保守序列的新型分子

标记方法^[5], 其根据植物功能基因或基因组中的保守序列设计引物, 以目的基因为标记点, 能产生与目标性状连锁的功能性分子标记^[6,7]. CDDP 分子标记操作简单、引物的多态性水平高、成本低, 并且可以区分亲缘关系极近品种^[8,9], 可广泛应用于植物的遗传多样性研究.

目前还未见到关于巴郎山杓兰的相关研究报告, 因此本研究从保护遗传学的角度, 利用 CDDP 分子标记技术研究了卧龙和王朗自然保护区 2 个居群巴郎山杓兰的遗传多样性, 同时通过调查和测定巴郎山杓兰的生境因子, 并基于皮尔森相关性分析了巴郎山杓兰遗传多样性与环境因子的相关性. 研究结果揭示了巴郎山杓兰的种群遗传结构和遗传多样性水平, 为分析其濒危原因以及保护措施的制定提供了理论依据.

表 1 巴郎山杓兰的采样地点和样品数量

Tab. 1 Sampling localities and number of *C. palangshanense*

编码	地点	经度/纬度	海拔(m)	取样数(个)
A1	四川汶川县卧龙	102°58'14"E/30°51'11"N	2830~2900	19
A2	四川汶川县卧龙	102°58'31"E/30°51'05"N	2900~2970	19
A3	四川汶川县卧龙	102°58'41"E/30°51'01"N	2970~3040	19
B1	四川平武县王朗	104°02'57"E/32°59'09"N	2900~2930	14
B2	四川平武县王朗	104°02'53"E/32°59'57"N	2930~2960	15
B3	四川平武县王朗	104°02'49"E/32°59'21"N	2960~2990	6

2.2 实验方法

2.2.1 DNA 提取 以单株巴郎山杓兰叶片组织样本为单位, 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京聚合美生物科技公司)提取 DNA, 检测 DNA 质量合格后保存于-80℃备用.

表 2 CDDP-PCR 反应体系正交试验 $L_{25}(5^3)$ 设计

Tab. 2 Design for CDDP-PCR reaction system orthogonal experimental $L_{25}(5^3)$

水平	因素		
	DNA 浓度 (ng/ μ L)	引物浓度 (μ mol/L)	Mix 添加 量(μ L)
1	20	0.2	6
2	30	0.4	7
3	40	0.6	8
4	50	0.8	9
5	60	1	10

2.2.2 CDDP-PCR 反应体系优化 采用 $L_{25}(5^3)$ 正交试验设计方法(表 2), 以 WRKY-R2B 为引物, 以两个居群巴郎山杓兰混合 DNA 为模板, 对 PCR 反应体系中的 DNA 浓度、引物浓度和 Mix

2 材料和方法

2.1 实验材料

植株叶片来源及处理: 巴郎山杓兰采自四川省卧龙自然保护区和王朗自然保护区(表 1), 每个居群按照海拔高度随机取样, 相邻取样植株间隔距离至少 5 m 以上, 共采集 92 株个体幼嫩叶片, 用变色硅胶快速干燥, 置于密封袋中带回保存备用.

土壤样品的采集及处理: 土壤采自巴郎山杓兰根系 0~1 cm 范围内 0~10 cm 土层, 在每个试验点范围内随机选取 3 个样点, 清理掉大块的石头、枝叶等残渣, 并将 3 个样点采集的土壤充分混合, 置于无菌自封袋中于当天带回实验室, 将其摊开置于通风处阴干. 风干的土样, 碾碎后过 2 mm 筛, 过筛的土样置于塑料瓶中保存, 标注编号、地点、日期、筛孔等信息.

添加量进行优化, 共 25 个正交试验组合(表 3), 每个组合设 3 个重复.

2.2.3 引物筛选 引物选用 Collard 与 Mackill 针对 WRKY、MYB、ERF、KNOX、MADS 及 ABP1 等转录因子或基因家族设计的 21 条 CDDP 引物, 由有康生物公司合成. 用优化的 CDDP-PCR 反应体系从 21 条引物中筛选出重复性好、多态性高的引物序列进行后续遗传多样性研究.

2.2.4 环境因子测定 土壤理化性质: 采用烘干法测定土壤含水量、电位法测定土壤 pH 值、重铬酸钾外加热法测定土壤有机质含量、碱解扩散法测定土壤碱解氮含量、(1/2H₂SO₄)法测定土壤速效磷含量、火焰光度法测定土壤速效钾含量、土壤温度测试仪测定土壤温度、尺子测量土壤厚度^[10].

地形因子: 经纬度、海拔、坡度、坡向由采样时 GPS 准确定位.

其他因子: 用线段法和针刺法测定木本层盖度、草本层盖度; 统计法统计每平方米巴郎山杓兰的最大密度.

表 3 CDDP-PCR 反应体系正交试验 $L_{25}(5^3)$ 组合
Tab. 3 CDDP-PCR orthogonal experimental $L_{25}(5^3)$ combination

序号	DNA 浓度 (ng/ μ L)	引物浓度 (μ mol/L)	Mix 添加量 (μ L)	ddH ₂ O (μ L)
1	20	0.2	6	11.4
2	20	0.4	7	10.4
3	20	0.6	8	9.4
4	20	0.8	9	8.4
5	20	1	10	7.4
6	30	0.2	7	10.4
7	30	0.4	8	9.4
8	30	0.6	9	8.4
9	30	0.8	10	7.4
10	30	1	6	11.4
11	40	0.2	8	9.4
12	40	0.4	9	8.4
13	40	0.6	10	7.4
14	40	0.8	6	11.4
15	40	1	7	10.4
16	50	0.2	9	8.4
17	50	0.4	10	7.4
18	50	0.6	6	11.4
19	50	0.8	7	10.4
20	50	1	8	9.4
21	60	0.2	10	7.4
22	60	0.4	6	11.4
23	60	0.6	7	10.4
24	60	0.8	8	9.4
25	60	1	9	8.4

2.2.5 数据处理与分析 CDDP-PCR 扩增产物按条带的有无分别统计,有条带记为“1”,无条带记为“0”,把得到的 0,1 分布矩阵转为文本文档. 用 POPGENE1.32 软件分别计算多态位点百分率(Percentage of polymorphic loci, PPL)、观测等位基因数(Number of observed alleles, N_a)、有效等位基因数(Number of effective alleles, N_e)、Nei’s 遗传多样性指数(Nei’s genetic diversity index, H)、Shannon 信息指数(Shannon Information index, I)、总群体基因多样性(Total population ge-

netic diversity, H_t)、种群内基因多样性(Genetic diversity within the population, H_s)、种群间遗传分化指数(Genetic differentiation index among populations, G_{st})、基因流(Gene flow, N_m)、Nei’s 遗传距离(Nei’s genetic distance, D)、遗传相似度(Genetic similarity, S). GenAlex 软件进行 AMOVA 分子方差分析. 应用 Ntsys2.1 中的 UP-GAM 法对居群进行聚类分析. 用 Excel 分析处理环境因子数据,用 SPSS 软件分析基于 CDDP 分子标记的遗传多样性参数与环境因子的相关性.

3 结果与分析

3.1 巴郎山杓兰居群的遗传多样性分析

3.1.1 CDDP-PCR 优化结果 根据正交试验结果(图 1)选择第 12 个组合作为 CDDP-PCR 反应的最佳体系. CDDP-PCR 扩增体系为 20 μ L,其中模板 DNA 浓度为 40 ng/ μ L,引物浓度 0.4 μ mol/L,2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 9 μ L.

3.1.2 引物筛选结果 从 21 条引物中筛选出 12 条条带清晰、多态性较好的引物(表 4)用于后续巴郎山杓兰遗传多样性扩增分析.

3.1.3 巴郎山杓兰的居群遗传多样性 以筛选的 12 条引物对巴郎山杓兰的 2 个居群 6 个试验点 92 个个体进行 CDDP-PCR 扩增,部分结果见图 2. 在物种水平上,共检测到 131 个位点,多态性位点 131 个,多态位点百分率(PPL)为 100%,平均每 条引物检测到 11 个位点,观测等位基因(N_a)和有效等位基因(N_e)分别为 2 和 1.5026,Nei’s 遗传多样性指数(H)为 0.3134,Shannon 信息指数(I)为 0.4856. 在居群水平上, N_a 的变化范围为 1.4504~1.9160,平均值为 1.7736; N_e 的变化范围为 1.2446~1.4336,平均值为 1.3556; H 在 0.1464~0.2679 之间, I 在 0.2231~0.4153,二者平均值分别为 0.2205 和 0.3432, PPL 的变化范围为 45.04%~91.60%,平均值为 77.35%(表 5).

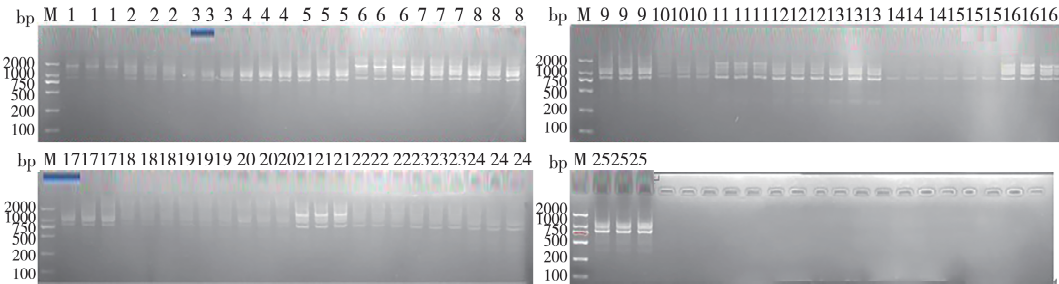


图 1 CDDP-PCR 反应扩增图谱
1~25; 正交实验组; M; DL2000 maker
Fig. 1 CDDP-PCR reaction amplification map of
1~25; Groups of orthogonal test; M; DL 2000 maker

表 4 CDDP 最优引物序列
Tab. 4 CDDP optimal primer sequence

编号	引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度/℃	总位点	多态位点	多态位点百分率/%
1	MYB1	GGCAAGGGCTGCCGC	59.4	16	16	100
2	MYB2	GGCAAGGGCTGCCGG	59.4	12	12	100
3	WRKY-F1	TGGCGSAAGTACGGCCAG	57.2	11	11	100
4	WRKY-R1	GTGGTTGTGCTTGCC	51.2	10	10	100
5	WRKY-R2B	TGSTGSATGCTCCCG	48.4	12	12	100
6	VRKY-R3B	CCGCTCGTGTGSACG	53.9	10	10	100
7	ERFI	CACTACCGCGSCTSCG	57.0	8	8	100
8	KNOX-1	AAGGSAAGCTSCCSAAG	50.3	13	13	100
9	KNOX-2	CACTGGTGGGAGCTSCAC	57.2	13	13	100
10	KNOX-3	AAGCGSCACTGGAAGCC	54.6	13	13	100
11	MADS-4	CTSTGCGACCGSGAGGTG	57.2	13	13	100
12	ABP1-3	CACGAGGACCTSCAGG	54.3	13	13	100

表 5 基于 CDDP 分子标记的巴朗山杓兰遗传多样性
Tab. 5 Genetic diversity of *C. palangshanense* based on CDDP molecular markers

Population	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>N_p</i>	PPL/%
A1	1.8321	1.3183	0.2037	0.3252	109	83.21
A2	1.8550	1.3741	0.2340	0.3670	112	85.50
A3	1.9160	1.4336	0.2679	0.4153	120	91.60
A-Average	1.8677	1.3753	0.2352	0.3692	113	86.77
B1	1.7710	1.3424	0.2154	0.3379	101	77.10
B2	1.8168	1.4204	0.2556	0.3907	107	81.68
B3	1.4504	1.2446	0.1464	0.2231	59	45.04
B-Average	1.6794	1.3358	0.2058	0.3172	89	67.94
Average	1.7736	1.3556	0.2205	0.3432	101	77.35
Species level	2.0000	1.5026	0.3141	0.4856	131	100.00

表 6 基于 CDDP 分子标记的巴郎山杓兰居群的 AMOVA 分析
Tab. 6 AMOVA analysis of *C. palangshanense* based on CDDP molecular markers

Source of variance	df	Sum of squares	MS	Variance component	Percentage of variation/%	<i>P</i> value
Among populations	5	710.211	142.042	8.166	30%	<0.001
Within population	86	1645.169	19.13	19.13	70%	<0.001
Total	91	2355.38		27.296	100%	

3.1.4 巴郎山杓兰的种群遗传分化 根据 POP-GENE 分析得出巴郎山杓兰总的基因多样性指数 (*H_t*) 为 0.3089, 居群内基因多样性指数 (*H_s*) 为 0.2205, 遗传分化系数 (*G_{st}*) 为 0.2863, 表明在居群间的遗传分化为 28.63%, 而 71.37% 的遗传分化发生在巴郎山杓兰的居群内. AMOVA 分析结

果显示,总的遗传变异中有 30%的变异发生在居群间,70%的变异发生在居群内(表 6),巴郎山杓兰存在着一定的遗传分化,但遗传分化主要来自居群内.居群间的基因流(Nm)为 1.2466,表明在巴郎山杓兰居群间存在基因流,但是基因流较弱.

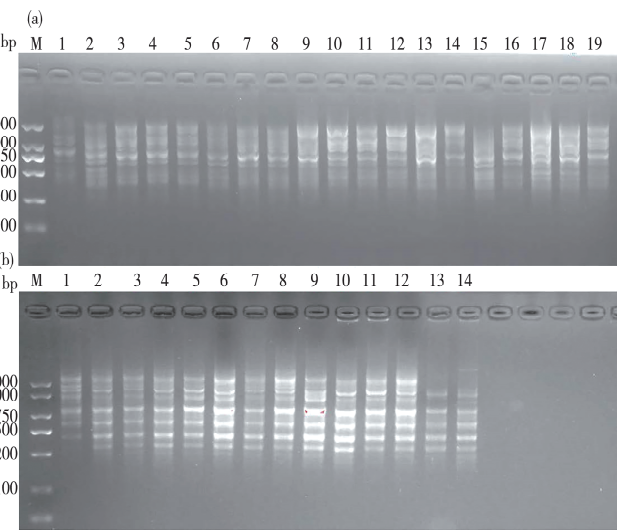


图 2 CDDP 引物 WRKY-R1 对卧龙居群和王朗居群部分个体的扩增图谱
a:卧龙居群;b:王朗居群;M:DL2000 Marker
Fig. 2 Amplification map of CDDP primer WRKY-R1 for some individuals in Wolong population and Wanglang population
a:Wolong population ; b:Wanglang population; M:DL2000 Marker

3.1.5 巴郎山杓兰居群间的遗传距离和遗传相似度 2 个巴郎山杓兰居群的遗传相似度(S)为 0.8513,遗传距离(D)为 0.1609;6 个试验点巴郎山杓兰的遗传相似度在 0.8451~0.9255 之间,遗传距离在 0.0775~0.1960 之间(表 7),其中 B1 和 B2 之间的遗传相似度最大,遗传距离最小;而 A3 和 B3 之间遗传相似度最小,遗传距离最大.在 CDDP 分子标记基础上建立的 UPGAM 聚类分析表明卧龙居群和王居群分别聚为两大类(图 3),其中卧龙居群的 A1 和 A2 在遗传相似系数为 0.89 时聚为一支,王朗居群的 B1 和 B2 在遗传相似系数为 0.93 时聚为一支. Mantel 检验结果表明,居群间的遗传距离与地理距离之间有显著的相关性($R^2=0.3830,P<0.05$).

3.2 遗传多样性与环境因子的相关性

根据居群遗传多样性研究结果表明卧龙居群遗传多样性高于王朗居群,且是目前最大的分布点,所以对卧龙居群巴郎山杓兰的生境因子做了调查和测定,同时还分析了卧龙居群巴郎山杓兰遗传多样性与环境因子的相关性,为进一步阐明巴郎山

杓兰遗传多样性的特性、解释其进化潜力及采取合理有效的保护策略提供依据.

表 7 基于 CDDP 分子标记的巴郎山杓兰遗传相似系数和遗传距离

Tab. 7 Genetic similarity coefficient and genetic distance of *C. palangshanense* based on CDDP molecular markers

pop	A1	A2	A3	B1	B2	B3
A1	* * * *	0.8890	0.8451	0.8683	0.8609	0.8226
A2	0.1177	* * * *	0.8706	0.8770	0.8560	0.8434
A3	0.1683	0.1386	* * * *	0.8486	0.8627	0.822
B1	0.1412	0.1313	0.1642	* * * *	0.9255	0.9150
B2	0.1498	0.1554	0.1477	0.0775	* * * *	0.8627
B3	0.1953	0.1703	0.1960	0.0888	0.1477	* * * *

注:对角线左下方为遗传距离,右上方为遗传一致度
Note:Genetic distance is below the diagonal and genetic consistency is above the diagonal

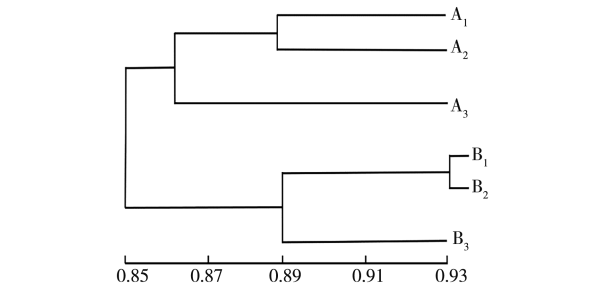


图 3 基于 CDDP 分子标记的巴郎山杓兰居群聚类图
Fig. 3 Clustering of *C. palangshanense* based on CDDP molecular markers

3.2.1 卧龙自然保护区巴郎山杓兰的环境因子 巴郎山杓兰居群三个不同海拔试验点的土壤 pH 介于 6.60~6.72 之间,为弱酸性土壤;土壤含水量(SMC)在 36.37%~48.25%之间;土壤有机质含量(SOM)在 37.42~63.55 $g \cdot kg^{-1}$ 之间;土壤速效磷含量(AP)在 9.11~11.86 $mg \cdot kg^{-1}$ 之间;土壤速效钾含量(AK)在 50.33~120.30 $mg \cdot kg^{-1}$ 之间;土壤碱解氮含量(AN)在 62.94~112.89 $mg \cdot kg^{-1}$ 之间;土壤厚度在 5~10cm 之间;土壤温度在 6~7 $^{\circ}C$ 之间.巴郎山杓兰在卧龙自然保护区主要分布在海拔 2830~3040 m 之间;坡度在 15~20 $^{\circ}$ 之间;坡向在 298~320 $^{\circ}$ 之间,即西北坡.木本层盖度在 45%~70%之间;草本层盖度在 35%~85%之间;每平方米巴郎山杓兰的最大密度在 3~6 株之间(表 8).

3.2.2 环境因子与遗传多样性的相关性 依据

SPSS 相关性分析对巴郎山杓兰各遗传多样性指数与环境因子进行相关性分析, 结果表明 CDDP 分子标记的各遗传多样性参数与环境因子之间有一定的相关性(图 4). 其中观测等位基因(N_a)、多态位点数(N_p)、多态位点百分率(PPL)与速效钾含量(AK)呈显著正相关; 有效等位基因数(N_e)、 Nei 's 遗传多样性指数(H)和 Shannon 信息指数(I)与海拔(Alt)呈显著正相关; 其余环境因子与遗传多样性指数之间没有显著相关性.

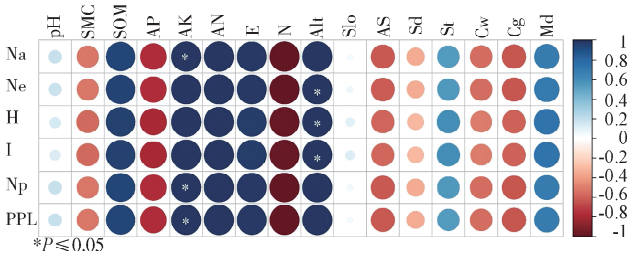


图 4 环境因子与遗传多样性指数的相关性
Fig. 4 Correlation between environmental factors and genetic diversity index

表 8 巴郎山杓兰的环境因子
Tab. 8 Enviromental factors of *C. palangshanense*

	pH	SMC/%	SOM/ (g · kg ⁻¹)	AP/ (mg · kg ⁻¹)	AK/ (mg · kg ⁻¹)	AN/ (mg · kg ⁻¹)	E	N	Alt/m	Slo/ (°)	AS/ (°)	SD/ cm	ST/ ℃	Cw/ %	Cg/ %	Md /株
A1	6.60±0.16	42.10±0.57	37.42±2.05	11.21±0.23	50.33±0.03	62.94±0.05	102°58'14"	30°51'11"	2830~2900	20	320	10	7	70	85	4
A2	6.72±0.22	48.25±0.39	41.19±0.46	11.86±0.23	73.43±0.02	81.49±1.55	102°58'31"	30°51'05"	2900~2970	15	298	5	6	45	35	3
A3	6.63±0.28	36.37±0.28	63.55±2.35	9.11±0.00	120.30±0.06	112.94±1.44	102°58'41"	30°51'01"	2970~3040	20	305	8	6.5	55	50	6

注: SMC: 土壤含水率; SOM: 土壤有机质含量; AP: 速效磷含量; AK: 速效钾含量; AN: 碱解氮含量; E: 经度; N: 纬度; Alt: 海拔; Slo: 坡度; AS: 坡向; Sd: 土壤厚度; St: 土壤温度; Cw: 木本层盖度; Cg: 草本层盖度; Md: 每平方米巴郎山杓兰的最大密度
Note: SMC: soil moisture content; SOM: content of soil organic matter; AP: available phosphorus content; AK: available potassium content; An: alkali hydrolyzable nitrogen content; E: Longitude; N: Latitude; A: Altitude; S: Slope; AS: Aspect; SD: soil thickness; ST: soil temperature; CW: coverage of woody layer; CG: herb layer coverage; MD: maximum density of *Cypripedium palangshanense* per square meter

4 讨 论

4.1 CDDP 分子标记与功能分析

CDDP 分子标记所用引物针对植物基因中保守 DNA 序列开发, 与其他随机分子标记相比, 趋向于产生与表型性状连锁的标记, 缩小了基因型与表型的差异, 能更有效地区分近缘种, 并且表现出较高的多态性水平^[11], 更能有效地揭示物种的遗传多样性水平, 可广泛应用于植物的遗传多样性研究. 基于 CDDP 分子标记方法, 巴郎山杓兰获得了 100% 的 PPL , 表明所使用的 CDDP 分子标记方法具有较高有效性, 适用于濒危物种巴郎山杓兰的遗传多样性分析. 目前, CDDP 引物在分子标记辅助育种、种质资源鉴定等方面已表现出较大的应用价值. 在已有 CDDP 引物扩增的功能蛋白或基因中, $WRKY$ 转录因子调控植物的生长发育; MYB 基因参与次生代谢反应、细胞形态建成和生物与非生物因素胁迫应答等生物学过程; ERF 转录因子调控逆境胁迫; 同源异型盒基因 $KNOX$ 家族调节花的生长发育和植物的形态构建; $MADS$ 基因调节花器官生长发育; $ABP1$ 转录因子参与生长素结合^[12]. 上述基因功能虽然在巴郎山杓兰中尚未得到研究和证实, 但是由于 CDDP 引物是基于功能

蛋白或基因保守序列设计的引物, 因此扩增得到的标记片段可能是目的基因的一部分或与基因紧密连锁, 因此, 基于功能蛋白或基因设计的 CDDP 分子标记引物在巴朗山杓兰种质资源鉴定、辅助育种等方面也具有潜在的应用价值.

4.2 巴郎山杓兰遗传多样性和遗传结构分析

一个物种的遗传多样性是动态的, 是在不同时空尺度的进化过程中形成. 物种的稳定性和进化潜力主要依赖其遗传多样性的高低. 因此, 评估遗传多样性是植物保护和生态恢复的重要组成部分. $Qian$ 等^[13]研究的中国中东部的扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum*) 在物种水平上 PPL 为 38.53%, H 为 0.1273 和 I 为 0.1928; $Pandey$ 等^[14]研究的美国北部肯塔基杓兰(*Cypripedium kentuckiense*) 在物种水平上 H 为 0.133; $Brzosko$ 等^[15]研究的波兰境内的杓兰(*Cypripedium calceolus*) 在物种水平上 PPL 为 36.4%, H 为 0.143. 与这些杓兰相比, 巴郎山杓兰的 PPL 、 H 和 I 分别为 100%、0.3141 和 0.4856, 在物种水平上呈现出较高水平的遗传多样性. 巴郎山杓兰虽然分布狭窄, 数量少, 但遗传多样性较高, 这可能与物种的进化历史和自身遗传特点有关, 巴郎山杓兰花小, 唇瓣呈球形兜囊状, 是一个特殊的“陷阱”, 昆虫

一旦钻进去,就只能从另一端的出口出来,这时背部就会擦上花粉,无意之中帮助巴郎山杓兰完成了异花授粉,这样一种传粉方式有利于维持较高的遗传多样性. 通常认为特有种、濒危种和狭域种表现出较低的遗传多样性,但是濒危植物并不一定表现出低的遗传多样性^[16-18]. 物种遗传多样性除与花的形态结构有关外,还与很多因素是相关的,如生活史特征和生态特征等.

居群的遗传结构是探讨生物适应力、物种形成以及进化机制的基础^[19],一个种群的生长环境、分布范围、种群大小和繁殖方式等均会对种群的遗传结构和遗传多样性产生影响,进而影响该物种的环境适应力和进化潜力^[20]. 兰科植物遗传分化系数(G_{st})的变化范围为 0.012~0.924,平均值为 0.187^[21],而巴郎山杓兰 G_{st} 分别为 0.2863. 当 G_{st} 为 0~0.05 时,认为群体间遗传分化很小; G_{st} 为 0.05~0.15 时,认为群体间存在中等程度的遗传分化; G_{st} 为 0.15~0.25 时,群体间遗传分化较大;而 $G_{st}>0.25$ 时,则认为群体间有很大的遗传分化^[22]. 说明巴郎山杓兰在群体间也是出现了较大的遗传分化. 推测可能与居群之间的交流有关,而不同居群之间的交流主要依靠花粉流和种子流,巴郎山杓兰的花期在降水比较集中的 7 月,并且传粉昆虫采用无回报的欺骗性传粉,传粉范围狭窄,此外巴郎山杓兰果实中所含的种子也可随风流和水流传播,但种子在自然条件下不易萌发,加之生境的片段化使得有效散播的受到限制,从而导致居群间出现了较大的遗传分化.

UPGAM 居群聚类分析发现卧龙居群和王朗居群分别聚为两支,其中卧龙居群的 A1 和 A2 为一支,A3 单独聚为一支,A1、A2 地理距离相近、海拔较低,传粉昆虫在居群间的传粉可能更多,基因交流更加频繁,并且两个试验点都分布在沟谷的同一侧,因而遗传相似度更大. 而 A3 海拔较高,在沟谷的另一侧,与 A1、A2 之间的基因交流较弱,从而导致其与其他两个试验点的遗传距离较远,遗传相似度较小,但是 A3 试验点的遗传多样性较高,推测可能是因为地理位置受到的人为干扰少,因此更有利于巴郎山杓兰生存和保护. 王朗居群三个试验点因植物实际分布导致海拔跨度较小,从图 3 可以看出 B1 和 B2 遗传距离较近,可能与两个试验点地理距离较近有关,且分布比较集中,植株数量较多,基因交流比较频繁,所以遗传距离较近;而 B3 试验点与 B1、B2 遗传距离较远,该点巴郎山杓兰

的分布较为稀疏,数量较少且地理距离较远,导致与 B1 和 B2 遗传相似度较小.

4.3 环境因子对遗传多样性的影响

生态环境因子在遗传多样性形成方面发挥着重要作用. 环境因子会对物种的遗传多样性产生影响^[23, 24],环境因子(如温度因素、湿度因素和土壤因素)与遗传多样性之间的关系是生态研究的重要组成部分. 在本研究中巴郎山杓兰的遗传多样性参数与多项环境因子呈正相关,其中多项遗传多样性参数与海拔高度(Alt)呈显著正相关,该结果在卧龙三个不同海拔试验点的遗传多样性中也得到印证,即海拔越高,遗传多样性也越高,其原因可能是海拔作为一个综合因素,直接影响着物种分布区域气温、降水等环境因子,从而改变整个小环境,对植物生长造成一定的选择压力而影响其遗传多样性. 此外,高海拔地区人为干扰少,有利于植株维持较高的遗传多样性. 另外,多项遗传多样性参数还与 AK 显著呈正相关,A3 试验点的 AK 含量最高,遗传多样性也最高. 钾通常可使植物在胁迫条件下具有较强的抵抗力,是植物生长发育所必需的营养成分,同时也是维持巴郎山杓兰较高遗传多样性的重要生态因子. 环境因子本就是相关影响、相互作用的一个复杂系统,植物的遗传多样性除了受环境因子对植物本身生长和分布的影响外,还受到很多因素的影响,且因物种而异. 因此我们要有针对性地对巴郎山杓兰的生境进行保护与修复,以期更好地保护好这样的极小种群野生植物.

4.4 巴郎山杓兰的保护建议

巴郎山杓兰作为一种极小种群植物,而极小种群在维护生态系统平衡中又起着关键作用,所以基于 CDDP 分子标记对巴郎山杓兰遗传多样、遗传结构以及和环境因子相关性的研究结果,提出以下保护策略:一、重视并加强就地保护,建立核心保护区,保护现有居群,因为任何一个居群的丧失都将导致遗传变异的流失,甚至发生灭绝. 二、根据遗传多样性与环境因子的相关性,保护和修复巴郎山杓兰居群的环境,并选择适宜环境进行迁地保护. 三、建立巴郎山杓兰的快速繁殖体系,进而建立人工栽培地,扩大种群数量和分布范围. 四、适当进行人工干预,如人工授粉、在不同居群间相互移植和混合繁殖的措施,促进居群间的基因交流,防止种群分化.

参考文献:

- [1] Ma Y, Chen G, Grumbine R E, *et al.* Conserving

- plant species with extremely small populations (PSESP) in China [J]. Biol Conserv, 2013, 22: 803.
- [2] 臧润国. 中国极小种群野生植物保护研究进展[J]. 生物多样性, 2020, 28: 263.
- [3] Yang J, Cai L, Liu D, *et al.* China's conservation program on Plant Species with Extremely Small Populations (PSESP): Progress and perspectives [J]. Biol Conserv, 2020, 244: 108535.
- [4] 郝云庆, 罗晓波, 王晓玲. 濒危植物五小叶槭(*Acer pentaphyllum* Diels)天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 161.
- [5] 李莹莹. 保守 DNA 衍生多态性 CDDP 分子标记技术及其应用[J]. 生物技术, 2013, 23: 78.
- [6] Poczai P, Varga I, Laos M, *et al.* Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review [J]. Plant Methods, 2013, 9: 6.
- [7] Jiang L Y, Zang D K. Analysis of genetic relationships in *Rosa rugosa* using conserved DNA-derived polymorphism markers [J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2017, 32: 88.
- [8] 罗铭欣, 刘凤民, 张伟丽, 等. SRAP 和 CDDP 标记在巴戟天遗传多样性分析中的应用[J]. 分子植物育种, 2021, 19: 3661.
- [9] 陈燕. CDDP 与 EST-SSR 标记在甘肃紫斑牡丹品种鉴定中的比较研究及遗传多样性分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
- [10] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [11] Igwe D O, Iheahuru O C, Osano A A, *et al.* Genetic diversity and population assessment of *Musa* L. (Musaceae) employing CDDP markers[J]. Plant Mol Biol Rep, 2021, 39: 801.
- [12] Collard B, Mackill D J. Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP): a simple and novel method for generating dna markers in plants [J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27: 558.
- [13] Qian X. Conservation genetics of an endangered lady's slipper orchid: *Cypripedium japonicum* in China [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15: 11578.
- [14] Pandey M, Richards M, Sharma J. Microsatellite-based genetic diversity patterns in disjunct populations of a rare orchid [J]. Genetica, 2015, 143: 693.
- [15] Brzosko E, Wróblewska A, Tałaj I, *et al.* Genetic diversity of *Cypripedium calceolus* in Poland [J]. Plant Syst Evol, 2011, 295: 83.
- [16] Zhang X J, Liu X F, Liu D T, *et al.* Genetic diversity and structure of *Rhododendron meddianum*, a plant species with extremely small populations [J]. Plant Divers, 2021, 6: 472.
- [17] Liu H, Zang F Q, Wu Q C, *et al.* Genetic diversity and population structure of the endangered plant *Salix taishanensis* based on CDDP markers [J]. Glob Ecol Conserv, 2020, 24: 1242.
- [18] Yu Y L, Wang H C, Yu Z X, *et al.* Genetic diversity and structure of the endemic and endangered species *Aristolochia delavayi* growing along the Jinsha River[J]. Plant Divers, 2021, 43: 225.
- [19] Wright S. The genetical structure of populations [J]. Ann Eugen, 2012, 15: 323.
- [20] 李菁, 张小飞, 陈珏屹, 等. 基于 ISSR 分子标记的西藏杓兰种群遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2020, 40: 969.
- [21] Forrest A D, Hollingsworth M L, Hollingsworth P M, *et al.* Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids [J]. Heredity, 2004, 92: 218.
- [22] Rousset F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance [J]. Genetics, 1997, 145: 1219.
- [23] 汪豪. 珍稀濒危植物小黄花茶(*Camellia luteoflora* Li ex H. T. Chang)的遗传多样性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [24] Huang W, Zhao X, Zhao X, *et al.* Effects of environmental factors on genetic diversity of *Caragana microphylla* in Horqin Sandy Land, northeast China [J]. Ecol Evol, 2016, 6: 8256.

引用本文格式:

中 文: 杨舒婷, 马晓娜, 白晓霖, 等. 极小种群野生植物巴郎山杓兰的 CDDP 遗传多样性分析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 066002.

英 文: Yang S T, Ma X N, Bai X L, *et al.* CDDP genetic diversity analysis of a very small population of wild plant *Cypripedium palangshanense* [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 066002.