

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201612036

引文格式: 滕婕华, 卫家贤, 李象钦, 等. 濒危特有种掌叶木的微卫星遗传多样性研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(11):1471-1479
TENG JH, WEI JX, LI XQ, et al. Endangered species endemic to microsatellite genetic diversity study on *Handeliidendron bodinieri* [J].
Guihaia, 2017, 37(11):1471-1479

濒危特有种掌叶木的微卫星遗传多样性研究

滕婕华¹, 卫家贤¹, 李象钦², 李超群³, 倪敏¹, 翁乐逸¹, 谢国文^{1*}

(1. 广州大学 生命科学院, 广州 510006; 2. 广西壮族自治区 广西植物研究所,
中国科学院
广西 桂林 541006; 3. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘 要: 掌叶木居群具有较丰富的遗传多样性, 该研究利用 9 对微卫星 (SSR) 分子标记揭示了掌叶木 (*Handeliidendron bodinieri*) 的遗传多样性。结果表明: 观测等位基因数 (N_a) 平均为 3.903, 有效等位基因数 (N_e) 平均为 2.545, 期望杂合度 (H_e) 平均为 0.521, Shannon's 多态性信息指数 (I) 为 0.962, PIC 平均值为 0.465。掌叶木的自然分布居群有相对较高的遗传多样性, 但由于人为破坏等因素导致该群体濒危, 而濒危并不是因为遗传多样性降低而造成的。居群间的遗传分化为掌叶木 8 个居群间的遗传一致度为 ($GI=0.849\sim0.970$), 遗传距离为 ($GD=0.032\sim0.164$)。基于 Nei's 遗传距离用 UPGMA 法对掌叶木居群进行聚类, Nei's 的基因分化系数为 (G_{st}) 为 0.027, 平均 Nei 标准遗传分化系数 ($G'_{st}N$) 为 0.031, 平均 Herick's 标准遗传分化系数 ($G'_{st}H$) 为 0.064, 基因流 (N_m) 为 3.368。AMOVA 分析结果表明: 掌叶木居群间变异占 3%, 居群内变异占 97%, 居群内的遗传分化大于居群间的分化。利用 Mantel 检测发现, 居群间的遗传距离与地理距离显著正相关 ($r=0.299, P<0.05$)。该研究结果为掌叶木生物多样性和资源保护与利用提供了更充分的科学依据。

关键词: 掌叶木, 微卫星 (SSR), 濒危植物, 遗传多样性, 毛细管电泳

中图分类号: Q949.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)11-1471-09

Endangered species endemic to microsatellite genetic diversity study on *Handeliidendron bodinieri*

TENG Jie-Hua¹, WEI Jia-Xian¹, LI Xiang-Qin², LI Chao-Qun³,
NI Min¹, WENG Le-Yi¹, XIE Guo-Wen^{1*}

(1. College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi
Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China; 3. Institute
of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

收稿日期: 2017-06-12 修回日期: 2017-07-21

基金项目: 国家自然科学基金 (31270259, 31540069); 全国大学生“挑战杯”课外科技活动项目; 大学生创新训练项目 (CX2016010) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270259, 31540069); National University of “Challenge Cup” in Extracurricular Scientific and Technological Activities; Innovation Training Program of University Students (CX2016010)]。

作者简介: 滕婕华 (1990-), 女, 广西南宁人, 硕士研究生, 主要从事植物资源保护与利用方面的研究, (E-mail) 522392024@qq.com。

*通信作者: 谢国文, 教授, 硕士研究生导师, (E-mail) xieguowen126@126.com。

Abstract: Genetic diversity of *Handeliidendron bodinieri* was studied with microsatellite (SSR) markers. We used nine pairs polymorphic microsatellite loci to reveal that *H. bodinieri* was rich in genetic diversity. Average number of alleles (N_a) and effective number of alleles (N_e) were 3.903 and 2.545 respectively. The mean expected heterozygosity (H_e) was 0.521 and Shannon's diversity (I) was 0.962 and $PIC = 0.465$. Natural populations of *H. bodinieri* had relatively high level of genetic diversity, however the genetic diversity of the populations were reduced due to factors like sabotage. The majority of genetic variation occurred within populations. The genetic distance (GD) and genetic identity (GI) among eight populations of *H. bodinieri* were 0.032–0.164, 0.849–0.970, respectively. According to genetic distance UPGMA, genetic differentiation ($G_{st} = 0.027$), $G'_{st}N = 0.031$, $G'_{st}H = 0.064$ and gene flow (N_m) was 3.368. The results analyzed by AMOVA showed that the variation among the populations was 3%, while the variation within the populations was 97%. Mantel test revealed that there was positive correlation between genetic distance and geographical distance ($r = 0.299$, $P < 0.05$) among the populations. The results are helpful to develop scientific and valid strategies for protecting the biodiversity of *H. bodinieri*.

Key words: *Handeliidendron bodinieri*, microsatellite (SSR), endangered plant, genetic diversity, capillary electrophoresis

掌叶木 (*Handeliidendron bodinieri*) 属于无患子科 (Sapindaceae) 掌叶木属 (*Handeliidendron*) 植物, 是中国特有单种属中国孑遗植物 (傅立国和金鉴明, 1992), 又称鸭脚板、平舟木、韩德木, 被列为国家 I 级保护植物。仅分布于我国广西与贵州接壤的喀斯特地貌的石灰岩山地常绿阔叶林中, 海拔高度在 500~900 m 之间的疏林或林缘, 密集的树林中较少。广西北部的乐业、田林、东兰、环江、南丹和贵州南部的荔波、平塘、独山等地 (张著林等, 2000)。木材质地坚硬, 是用于工程建设及制作家具的良好材料, 且种子可用于榨油, 具有重要的经济开发价值 (贾良志和周俊, 1987; 陈波涛等, 2007)。掌叶木根系发达, 依靠根系深入到石缝之中吸取养料来维持生存; 具掌状复叶, 与其它无患子科植物的羽状复叶不同。其植物分类系统位置介于无患子科与七叶树科之间, 对于研究无患子科和七叶树科的系统发育具有重要的意义。

遗传多样性是指存在于不同生物个体内、单个物种内及多个物种间总的遗传变异 (Hughes et al, 2008)。由于单一或生物个体较稀少的物种中遗传变异是有限的, 所以较难适应千变万化的环境; 而在不同个体中, 居群拥有丰富的遗传变异, 因此能更好地去适应变化中的环境 (Rao & Hodgkin, 2002; Pauls et al, 2013)。不同物种间多样性与不同群体遗传结构有很大的区别, 所以, 采取正确的策略和

措施对物种进行保护, 前提一定要建立在对该物种群体遗传学的研究之下 (赵冰等, 2015)。微卫星又称简单重复序列 (SSR), 是现阶段研究群体遗传多样性较好的标记 (Arnold & Emms, 1998)。SSR 标记在真核生物基因组中是随机分布的, 由于其丰富的多态性和共显性遗传等特征, 被广泛应用于种间和种内遗传多样性的分析。国内有开展过掌叶木的有性繁殖、芽苗移栽、迁地保护、居群生态、种子生态以及生物学特性等研究 (周洪英和张著林, 2000; 韦小丽等, 2006; 黄仕训等, 2002; 张著林和林昌虎, 2006; 常进雄等, 2002; 熊志斌等, 2003; 曹丽敏等, 2006)。但是, 在群体遗传多样性方面的研究相对滞后, 仅见 Wang et al (2008)、贺瑞坤等 (2011) 进行了掌叶木微卫星分子标记的相关开发及 He et al (2012) 对掌叶木的遗传多样性和居群遗传结构的研究报道, 但研究中取的居群数仅为茂兰自然保护区一个, 结果尚需进一步验证。

本研究通过前人已开发的 SSR 引物, 对掌叶木自然分布区采集 8 个居群进行实验, 试图进一步确认掌叶木的居群遗传多样性和遗传结构, 为掌叶木生物多样性保护和利用提供更充分的科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

在掌叶木植物分布范围内进行居群广泛调查

表 1 掌叶木居群采样地理位置

Table 1 Sampling locations in the populations of *Handeliidendron bodinieri*

居群 Population	样方地点 Location	海拔 Altitude (m)	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	采样数 Sample size
DL	广西东兰 Donglan, Guangxi	510	107°36'	24°53'	24
DS	贵州独山 Dushan, Guizhou	880	107°56'	26°03'	24
HJ	广西环江 Huanjiang, Guangxi	1 300	108°14'	26°31'	24
LB	贵州荔波 Libo, Guizhou	759	107°53'	25°39'	24
LY	广西乐业 Leye, Guangxi	970	106°29'	24°48'	24
ND	广西南丹 Nandan, Guangxi	668	108°08'	25°09'	24
PT	贵州平塘 Pingtang, Guizhou	710	107°42'	26°19'	24
TL	广西田林 Tianlin, Guangxi	944	106°24'	24°31'	24

表 2 掌叶木 SSR 引物序列

Table 2 Sequences of SSR primer sets of *Handeliidendron bodinieri*

引物名称 Primer name	条带碱基大小 Band size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	引物序列 Primer sequence
ZYM57	233~241	52	F: CGGCCATAATCTCTCTCCAC R: CACTCCTACCATTCCGCCATT
ZYM223	176~178	56	F: GCTTTTTCGTTTCCAAGTTCA R: CGAGGAAGACCAAGCAAAAAG
ZYM245	129~131	56	F: GAAGAGGAGCACCCCTGATTG R: CTTTTGGTGTTTTGGGTTGG
ZYM246	232~238	60	F: ACTGATCCAGGGTTCGTGTC R: ACGCTAGGGTTGAAAAGCAA
ZYM270	150~157	62	F: GACTGGCTGGCACATCATAA R: ATCGTTATCGGAGCATCGAC
ZYM304	175~180	60	F: AAAATGGCCAACGAAAACAG R: GAAATGCCGACCTCCAATAA
HBOD10	120~160	56	F: GTTGCATAAAATTGCTTATATG R: GATGTAGCAATGAAGTGCAAGTG
HBOD26	152~162	56	F: GGCATGCCAATCTTCCAATA R: TGACCTGAAAAATGGATGGA
HBOD33	240~270	56	F: GGAAGCAATCCAGGAACAGA R: GGTACATTTTCCCGGTAGGC

与采样,从广西西北部的东兰(DL)、南丹(ND)、环江(HJ)、乐业(LY)、田林(TL)到贵州南部的独山(DS)、荔波(LB)、平塘(PT)8个居群(表1),分别采集24个个体(个体之间的距离在30 m以上,以免克隆株)的新鲜叶片,个体数量相等才能更科学的衡量遗传多样性水平。硅胶干燥保存,带回实验室放入4 °C冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 采用博迈德快速提取试剂盒(购自北京博迈德生化科技有限公司)对掌叶木叶片进行总DNA提取。采用紫外可见分光光度计对DNA的含量及纯度进行测定,所提取的DNA质量用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.2 PCR 扩增与毛细管电泳 通过隔号选取96

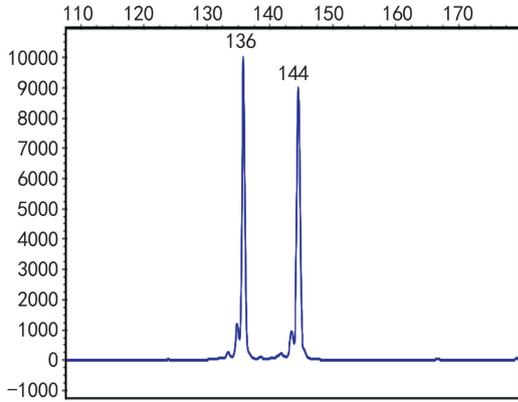


图 1 引物 ZYM245 毛细管电泳结果图

Fig. 1 Capillary electrophoresis graphs of ZYM245

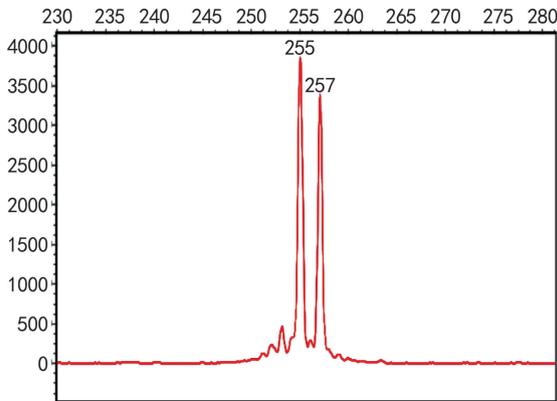


图 2 引物 ZYM57 毛细管电泳结果图

Fig. 2 Capillary electrophoresis graphs of ZYM57

个双数掌叶木个体 DNA 进行实验。用 9 对 SSR 引物对 96 份掌叶木材料进行 PCR 扩增,9 对引物分别从前人已开发(Wang et al, 2008; 贺瑞坤等, 2011)并通过筛选进行实验(表 2),在正向引物 5' 端以磷荧光染料标记。

PCR 总反应体系在 10 μL 的体积中进行,包括模板 DNA 0.5 μL ,正反引物各 0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2 \times PCR Master Mix 5 μL ,加 ddH₂O 补至 10 μL 。反应程序如下:先 95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预变性 5 min,而后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,52~56 $^{\circ}\text{C}$ (视引物 T_m 值而定)退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,循环 30 次,最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 条件下在延伸 4 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

利用毛细管电泳法(CE)将 PCR 的产物在 ABI-3730 XL 基因分析仪上进行检测结果。每个 CE 样品中含有 0.3 μL PCR 产物、0.5 μL Genescan-500 分子量内标和 9.5 μL 去离子甲酰胺。混合加入 96 孔板,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却后离心,1 \times Buffer 缓冲液上机检测,PCR 产物和 Genescan-500 分子量标准的荧光信号均可在毛细管电泳的过程中由基因分析仪自动保存(图 1,图 2)。

1.2.3 数据分析 使用 GeneMarker-V2.2.0 软件对 ABI-3730XL 基因分析仪收集到的数据进行分析,统计得出不同的 SSR 引物对掌叶木扩增得到的 SSR 标记片段,将 SSR 标记片段与 Genescan-500 分子量内标比较,得到不同片段长度大小序列,利用 Genepop 软件和 GenAlEx 6.5 软件进行数据分析,计算掌叶木各居群的多态位点百分率、Nei's 基因多样性(Nei)、Shannon's 遗传多样性信息指数、遗传分化系数(F_{st})、基因流(N_m)、居群间遗传距离与遗传一致度,及 AMOVA 分析和 Mantel 相关分析性检验等,并利用 MEGA5.0 软件来构建 NJ 遗传关系树。

2 结果与分析

2.1 居群遗传多样性参数

通过隔号选取 96 份掌叶木个体,筛选出 9 对 SSR 分子标记,进行遗传多态性分析,结果见表 3。由表 3 可知,单个居群的多态性位点百分率(PPB)变化范围在 89%~100%之间,平均为 97%,观测等位基因数(N_a)变化范围在 2.889~4.444 之间,平均为 3.903,有效等位基因数(N_e)变化范围在 2.283~2.791 之间,平均为 2.545,期望杂合度(H_e)变化范围在 0.442~0.568 之间,平均为 0.521,Shannon's 多态性信息指数(I)变化范围在 0.818~1.061 之间,平均为 0.962。8 个居群按各多样性指标排序,结果表明,东兰(DL)居群的遗传多样性最高(PPB=100%, H_e =0.564, I =1.061),PIC 值为 0.511,环江(HJ)居群的信息指数最低(PPB=89%, H_e =0.483, I =0.818),PIC 值为 0.421,且与其他居群的差异较为显著。通过研究结果比较,在本研究中,掌叶木的期望杂合度

表 3 掌叶木 8 个不同居群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of eight populations of *Handeliidendron bodinieri*

居群 Population	多态位点百分率 PPB (%)	观测等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	期望杂合度 H_e	Shannon's 多态性 信息指数 I	多样性指数 PIC
DL	100	4.222	2.591	0.564	1.061	0.511
DS	100	4.111	2.573	0.568	1.038	0.505
HJ	89	2.889	2.283	0.483	0.818	0.421
LB	100	4.333	2.681	0.566	1.047	0.500
LY	100	3.889	2.585	0.442	0.858	0.401
ND	100	4.444	2.791	0.539	1.038	0.487
PT	100	4.111	2.437	0.526	0.981	0.470
TL	89	3.222	2.421	0.477	0.855	0.426
平均 Mean	97	3.903	2.545	0.521	0.962	0.465

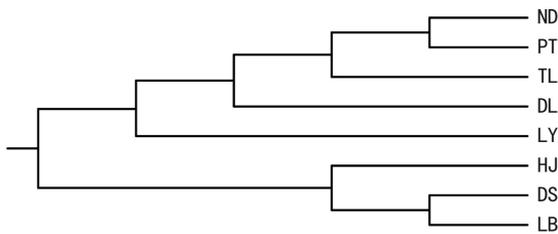


图 3 基于 Nei's 遗传距离构建的 N-J 聚类树
Fig. 3 Consensus neighbor-joining tree of Nei's genetic distance

($H_e = 0.442 \sim 0.568$, Mean = 0.521), 与 He et al (2012) 研究掌叶木的期望杂合度 ($H_e = 0.463 \sim 0.510$, Mean = 0.489), 数值较为相近。

2.2 居群遗传结构

为进一步研究掌叶木居群间的遗传分化程度, 根据 9 对 SSR 引物扩增的结果, 计算各居群间的 Nei's 遗传距离 (GD) 和遗传一致度 (GI), 以此来判定居群间相互关系的远近, 表明每 8 个居群之间彼此关系的密切程度。由表 4 中的数据可知, 掌叶木 8 个居群间的遗传一致度为 ($GI = 0.849 \sim 0.970$), 遗传距离为 ($GD = 0.032 \sim 0.164$), 即 8 个居群的遗传一致度较高, 遗传距离较小, 彼此之间关系密切。根据遗传距离利用 UPGMA 法

对 8 个居群进行聚类分析, 聚类结果见图 3。从图 3 可以看出, 掌叶木这 8 个自然居群基本上符合了采集点的地理分布。

2.3 居群遗传分化

2.3.1 遗传分化系数 利用 GenAlEx 6.5 软件统计掌叶木 9 个微卫星位点的遗传分化系数 (G_{st})、Nei 标准遗传分化系数 (G'_{st})、Herick's 标准遗传分化系数 ($G'_{st}H$)、Jost's 变异估计 (D_{est}) 等指数 (表 5)。表 5 结果显示, 在 9 对 SSR 引物中, 8 个掌叶木居群的平均 Nei 标准遗传分化系数 ($G'_{st}N$) 为 0.031, 平均 Herick's 标准遗传分化系数为 0.064。

根据 Nei's 总基因多样性 (H_t) 及居群内基因多样性 (H_s) 来计算掌叶木的遗传分化水平 (G_{st})。由表 6 可知, 掌叶木居群的总基因多样性平均为 0.552, 其中居群内基因多样性平均为 0.521, Nei's 的基因分化系数平均为 0.027, 表明总变异中有 2.7% 的变异存在于居群间, 97.3% 的变异存在于居群内。各居群间的基因流 (N_m) 为 3.368, 居群内的遗传分化大于居群间的分化。

2.3.2 分子遗传变异分析 (AMOVA) 通过对掌叶木 96 个样品进行 AMOVA 分析, 从居群遗传变异分析结果 (表 7) 可以看出, 来源于居群间的遗传变异占 3%, 而来源于居群内的遗传变异占 97%, 表明居群内的遗传变异大于居群间, 遗传分化达到

表 4 居群间的 Nei's 遗传距离 (GD) 和遗传一致度 (GI)

Table 4 Nei's genetic distance and genetic identity between populations

居群 Population	DL	DS	HJ	LB	LY	ND	PT	TL
DL	* * * *	0.884	0.910	0.898	0.939	0.926	0.956	0.952
DS	0.123	* * * *	0.926	0.970	0.849	0.947	0.933	0.915
HJ	0.094	0.077	* * * *	0.935	0.912	0.928	0.913	0.943
LB	0.107	0.031	0.068	* * * *	0.859	0.958	0.948	0.927
LY	0.063	0.164	0.093	0.152	* * * *	0.919	0.908	0.945
ND	0.076	0.055	0.075	0.043	0.085	* * * *	0.968	0.966
PT	0.045	0.069	0.091	0.053	0.096	0.032	* * * *	0.965
TL	0.049	0.089	0.058	0.076	0.056	0.035	0.035	* * * *

注: Nei's 遗传距离(左下角)、遗传一致度(右上角)。

Note: Nei's genetic distance(left bottom) and genetic identity(right top).

表 5 9 个微卫星位点的 G-统计指数

Table 5 Summary of G-statistics for nine microsatellite loci

微卫星 位点 Locus	遗传分 化系数 G_{st}	Nei 标准遗传 分化系数 $G'_{st}N$	Herick's 标准 遗传分化 系数 $G'_{st}H$	标准遗传 分化系数 G''_{st}	Jost's 变异 估计 D_{est}	显著性 P G_{st}
ZYM57	0.011	0.013	0.025	0.027	0.014	0.200
ZYM223	0.089	0.100	0.110	0.122	0.024	0.001
ZYM245	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
ZYM246	0.032	0.037	0.057	0.061	0.026	0.086
ZYM270	0.020	0.023	0.072	0.075	0.054	0.015
ZYM304	0.063	0.071	0.107	0.114	0.047	0.005
HBOD10	0.024	0.028	0.146	0.149	0.125	0.001
HBOD26	0.001	0.001	0.003	0.003	0.002	0.378
HBOD33	0.052	0.059	0.199	0.205	0.155	0.001
平均值 Mean	0.027	0.031	0.064	0.067	0.038	0.001

表 6 掌叶木居群的遗传分化分析

Table 6 Analysis of genetic differentiation among populations of *Handeliidendron bodinieri*

居群 Population	Nei's 总基因多样性 H_t	Nei's 居群内基因多样性 H_s	Nei's 基因分化系数 G_{st}	居群间基因流 N_m
平均值 \bar{x}	0.552	0.521	0.027	3.368
标准差 s	0.067	0.064		

表 7 AMOVA 分析结果

Table 7 Results of analysis on Molecular Variance

变异来源 Source of variation	自由度 df	总平方和 SS	均方差 MS	变异组分 Variance component	变异 百分比 Variance (%)	显著性 P
居群间 Among populations	7	26.766	3.824	0.077	3	<0.001
居群内 Within population	96	278.500	2.901	2.901	97	<0.001
总和 Total	103	305.266		2.978	100	

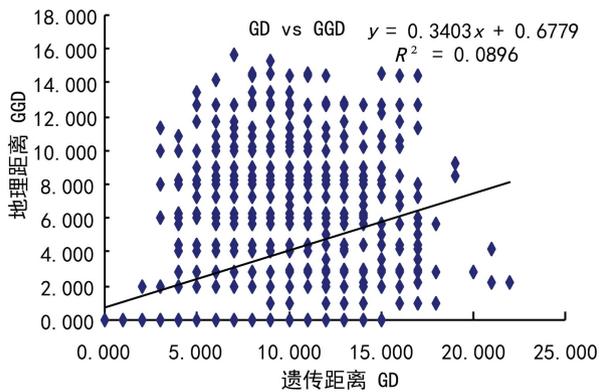


图 4 遗传距离(GD)和地理距离(GGD)的相关性检验

Fig. 4 Genetic distance (GD) and geographical distance (GGD) correlation test

了极显著水平($P < 0.001$)。AMOVA 分析结果与基因分化系数(G_{st})值所得结果一致。

2.4 Mantel 相关性检验

在本研究中,利用 Mantel 检测遗传距离(GD)和地理距离(GGD)的相关性,结果见图 4。由图 4 的线性关系来看,图中直线表明为正相关,且 $r = 0.299$, $P = 0.01$, $P < 0.05$ 为显著,说明掌叶木遗传距离与地理距离显著正相关。

3 讨论

3.1 掌叶木的遗传多样性

SSR 分子标记具有较好的稳定性、多态性高、

共显性、引物特异性强等特点,是重要的 DNA 标记技术之一(高志红等,2002),且该技术较成熟,因此被广泛运用于遗传多样性的研究当中。采用不同分子标记进行研究的群体具有较大差别的遗传多样性(徐立安等,2001;朱其慧等,2002)。

以观测等位基因数(N_a)作为衡量 SSR 位点多态性和居群变异程度高低的重要指标。在本实验中,使用的 9 个 SSR 位点在 8 个掌叶木居群上的平均观测等位基因数为 3.903。以 Shannon's 信息指数作为评价遗传多样性的重要指标;以生物多样性指数 PIC 值来说明不同居群间的遗传多样性。在本研究中,9 个 SSR 位点在 8 个掌叶木居群上得到其物种水平上 $I = 0.962$, PIC 平均值为 0.465,表明不同居群间的遗传多样性较高。掌叶木的期望杂合度($H_e = 0.442 \sim 0.568$, Mean = 0.521),与 He et al(2012)研究掌叶木的期望杂合度($H_e = 0.463 \sim 0.510$, Mean = 0.489),数值较为相近。而与掌叶木的一个近缘种无患子科伞花木(*Eurycorymbus cavaleriei*)($H_e = 0.710 \sim 0.754$)相对而言,掌叶木的遗传多样性较低。

3.2 居群遗传结构

掌叶木 8 个居群间的遗传一致度为($GI = 0.849 \sim 0.970$),遗传距离为($GD = 0.032 \sim 0.164$),即 8 个居群的遗传一致度高,遗传距离较小,彼此之间关系密切。基于遗传距离进行聚类分析,发现掌叶木这 8 个自然居群基本上符合了采集点的地理分布。

遗传分化是反映遗传结构的重要指标。本研究中 8 个掌叶木居群的平均 Nei 标准遗传分化系数为 0.031,平均 Herick's 标准遗传分化系数为 0.064,Nei's 的基因分化系数平均为 0.027,说明总变异中只有 2.7% 的变异存在于居群间,97.3% 的变异存在于居群内,大部分变异来自于居群内。居群内的遗传分化大于居群间的分化。用 AMOVA 方法进行方差分析结果表明:掌叶木居群间变异占 3%,居群内变异占 97%,居群间和居群内的变异均是极为显著($P < 0.001$),此分析结果与基因分化系数所得结论一致。

一般认为当基因流(N_m)大于 1 时,则它能足以抵制遗传漂变的作用,并能防止遗传漂变导致

居群遗传分化的发生 (Slatkin, 1981)。通过本实验研究,测得的居群间基因流值为 3.368,属于较高水平,这表明各居群间基因交流较为频繁。在本实验研究中,居群间存在一定的基因交流很可能是影响 8 个居群遗传结构的主要因素。用于本研究中所涉及到的 8 个居群均来自喀斯特地貌,推测其原因可能为(1)因为掌叶木的花粉可以随风散播,花粉与种子可以随风四处散播 (Greene, 2005);(2)河流和以掌叶木果实为生的动物是远距离的传播基因交流等。

通过计算得出的遗传距离和地理距离,利用 Mantel 检测进行相关性分析,得出结论: $r = 0.299$, $P = 0.01$, $P < 0.05$ 为显著,遗传地理与地理距离显著正相关。由于掌叶木分布范围较小,生长在中国特有的喀斯特地貌,且其分类地位孤立。因此,掌叶木的遗传距离与地理距离呈正相关,和其分布的地理位置有关。

通过野外调查得知,掌叶木多以星散分布为主,密林中很少见,多生长在疏林或林缘。掌叶木的自然分布居群有相对较高的遗传多样性,但是由于人为破坏等因素导致该群体濒危,而濒危并不是因为遗传多样性降低而造成的。本研究首次对掌叶木目前已知的所有居群进行遗传多样性分析,而同类研究掌叶木的 Wang et al (2008)、贺瑞坤等(2011)及 He et al(2012)都只是选取了生长在荔波的一个居群。其中,Wang et al (2008)及贺瑞坤等(2011)开发了掌叶木的微卫星 SSR 引物,但未对其遗传多样性进行分析研究。因此,本研究对于分析掌叶木的遗传多样性信息更具有科学依据。从实验结果显示,掌叶木单个居群内遗传多样性较丰富,但是居群间遗传分化较小。因此,通过该实验得到的遗传信息将为濒危植物掌叶木生物多样性保护和利用提供科学的依据。在掌叶木保护措施上,应该以居群保护为重点,并且在较大程度内保护现有个体数量的完整性来维护掌叶木居群的繁衍,应加大保护防止生长在林缘的掌叶木个体因人为了砍伐或其他因素破坏而造成遗传多样性损失。

参考文献:

- ARNOLD ML, EMMS SK, 1998. Molecular markers, gene flow, and natural selection [M]//SOLTIS DE, SOLTIS PS, DOYLE JJ. Molecular systematics of plants II. Delhi: K A Publishers: 442-457.
- CAO LM, XIA NH, DENG YF, 2006. Floral organogenesis of *Handeliidendron bodinieri* (Sapindaceae) and its systematic implications [J]. Acta Phytotax Sin, 44 (4): 393-400. [曹丽敏, 夏念和, 邓云飞, 2006. 掌叶木的花器官发生及其系统学意义 [J]. 植物分类学报, 44 (4): 393-400.]
- CHANG JX, YANG L, HUANG WL, 2002. A study on *Handeliidendron* population ecology in South Guizhou [J]. Guizhou Sci, 20 (2): 1-15. [常进雄, 杨龙, 黄威廉, 2002. 贵州南部掌叶木种群生态研究 [J]. 贵州科学, 20 (2): 1-15.]
- CHEN BT, YU JP, DENG BL, et al, 2007. Analysis of economic character on woody fuel oil plant of *Handeliidendron bodinieri* in Guizhou Province [J]. Resourc Dev Mark, 23 (6): 514-516. [陈波涛, 郁建平, 邓伯龙, 等, 2007. 贵州木本燃油植物掌叶木的经济性状分析 [J]. 资源开发与市场, 23 (6): 514-516.]
- FU LG, JIN JM, 1992. China plant red data book: rare and endangered plants(Book I) [M]. Beijing: Science Press. [傅立国, 金鉴明, 1992. 中国植物红皮书-稀有濒危植物 [M]. 第 1 册. 北京: 科学出版社.]
- GAO ZH, ZHANG Z, HAN ZH, 2002. SSR technique and development of the study in fruit science [J]. J Fruit Sci, 19 (5): 281-285. [高志红, 章镇, 韩振海, 2002. SSR 技术及其在果树上的应用 [J]. 果树学报, 19(5): 281-285.]
- GREENE DF, 2005. Therole of abscission in long-distance seed dispersal by the wind [J]. Ecology, 86(11):3105-3110.
- HE RK, WANG J, HUANG HW, 2011. Isolation of novel microsatellite loci for *Handeliidendron bodinieri* (Sapindaceae), an endangered tree endemic to karst forest in Southwestern China [J]. J Trop Subtrop Bot, 19 (6): 493-498. [贺瑞坤, 王静, 黄宏文, 2011. 我国西南部喀斯特森林特有濒危物种掌叶木新的微卫星分子标记的开发 [J]. 热带亚热带植物学报, 19 (6): 493-498.]
- HE RK, WANG J, HUANG HW, 2012. Long-distance gene dispersal inferred from spatial genetic structure in *Handeliidendron bodinieri*, an endangered tree from karst forest in southwest China [J]. Biol Sys Ecol, 44: 295-302.
- HUANG SX, LUO WH, TANG WX, et al, 2002. Study on the adaptability of the rare and threatened limestone plants ex-situ conservation [J]. Guihaia, 22(2): 136-139. [黄仕训, 骆文华, 唐文秀, 等, 2002. 石山稀有濒危植物迁地保护适应性研究 [J]. 广西植物, 22(2): 136-139.]
- HUGHES AR, INOUE BD, JOHNSON MTJ, et al, 2008. Ecological consequences of genetic diversity [J]. Ecol Lett, 11: 609-623.
- JIA LZ, ZHOU J, 1987. Oil plants in China [M]. Beijing: Sci-

- ence Press: 334–335. [贾良志, 周俊, 1987. 中国油脂植物 [M]. 北京: 科学出版社: 334–335.]
- PAULS SU, NOWAK C, BALINT MOS, et al, 2013. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species [J]. *Mol Ecol*, 22: 925–946.
- RAO V, HODGKIN T, 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 68: 1–19.
- SCHGTTTERER C, 1998. *Microsatellites [M]//HOELZEL A. Molecular genetic analysis of population. Oxford: Oxford University Press.*
- SLATKIN M, 1981. Estimating levels of gene flow in natural populations [J]. *Genetics*, 99: 323–335.
- WANG J, GAO PX, KANG M, 2008. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered tree *Handeliidendron bodinieri* (Sapindaceae) [J]. *Con Genetics*, 9 (3): 727–729.
- WEI XL, LIAO M, ZHU ZR, et al, 2006. Study on growth regularity and technology of density control of *Handeliidendron bodinieri* (Lévl.) transplant stock using the bud seedling [J]. *Mou Agric Biol*, 25 (1): 9–12. [韦小丽, 廖明, 朱忠荣, 等, 2006. 芽苗移栽掌叶木的生长规律与密度调控技术 [J]. 山地农业生物学报, 25 (1): 9–12.]
- XIONG ZB, RAN JC, TAN CJ, et al, 2003. The seed ecological characteristics of endangered *Handeliidendron bodinieri* [J]. *Acta Ecol Sin*, 23 (4): 820–825. [熊志斌, 冉景丞, 谭成江, 等, 2003. 濒危植物掌叶木种子生态特征 [J]. 生态学报, 23 (4): 820–825.]
- XU LA, LI XJ, PAN HX, et al, 2001. Study on population genetic structure in *Castanopsis fargesii* with microsatellite markers [J]. *Acta Bot Sin*, 43(4): 409–412. [徐立安, 李新军, 潘惠新, 等, 2001. 用 SSR 研究栲树群体遗传结构 [J]. 植物学报, 43(4): 409–412.]
- ZHANG ZL, LIN CH, 2006. Study on the introduction and preservation of *Handeliidendron bodinieri* (Lévl.) Rehd. Wei in allopatry [J]. *Guizhou Sci*, 24 (4): 45–48. [张著林, 林昌虎, 2006. 掌叶木异地引种保护研究 [J]. 贵州科学, 24 (4): 45–48.]
- ZHANG ZL, ZOU TC, HE M, et al, 2000. Investigation of community of *Handeliidendron bodinieri* in Guizhou [J]. *Guizhou Sci*, 18(4): 12–18. [张著林, 邹天才, 何梅, 等, 2000. 贵州掌叶木群落调查 [J]. 贵州科学. 18(4): 12–18.]
- ZHAO B, ZHENG XZ, LI HH, 2015. Genetic diversity of five wild populations of *Rhododendron calophytum* in Qinling, China by ISSR analysis [J]. *Guihaia*, 35(5): 761–767. [赵冰, 郑茜子, 李厚华, 2015. 秦岭山区美容杜鹃五个野生种群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 广西植物, 35(5): 761–767.]
- ZHOU HY, ZHANG ZL, 2000. Test and conservation on sexual propagation of *Handeliidendron bodinieri* (Lévl.) Rehd [J]. *Guizhou For Technol*, 28 (4): 30–33. [周洪英, 张著林, 2000. 掌叶木有性繁殖试验与观察 [J]. 贵州林业科技, 28 (4): 30–33.]
- ZHU QH, PAN HX, ZHUGE Q, et al, 2002. Analysis of genetic structure of natural populations of *Castanopsis fargesii* by RAPDs [J]. *Acta Bot Sin*, 44(11): 1321–1326. [朱其慧, 潘惠新, 诸葛强, 等, 2002. 栲树天然群体遗传结构的 RAPD 分析 [J]. 植物学报, 44(11): 1321–1326.]