

## 大针茅居群遗传分化和 RAPD 位点多态性分布的分析\*

赵念席, 高玉葆\*\*, 王金龙

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

**摘要:** 利用 RAPD 分子标记技术对 5 个居群的 90 个大针茅个体间的遗传关系以及 RAPD 多态性与所在生境的相关性进行了研究。16 个引物共扩增得到 310 个 RAPD 位点, 利用几种多元分析方法对所得位点进行分析, 结果显示: 主轴法分析能够在三维坐标下将 90 个大针茅个体按居群来源进行分类, 前三个轴虽然只解释了总变异的 21.91%, 却能将所研究的居群完全分开; 典范判别分析可以将 97.8% 的大针茅个体正确地分类到已知居群, 且在二维功能轴下能够清晰地看到个体按居群来源进行了分类; Spearman 秩相关分析和多元逐步回归分析均得出大针茅 RAPD 位点的 Nei's 基因多样性与气候因子 (包括年降水量、积温、年均温、一月份均温和七月份均温) 之间存在显著的关联性。基于以上结果我们可以得出: 大针茅地理居群分化显著; 大针茅 RAPD 多样性并非随机分布而是与生境气候因子相联系; 气候差异的自然选择, 对大针茅遗传多样性和遗传结构的特点起决定作用。研究结果对大针茅种质资源的保护具有重要的指导意义。

**关键词:** 大针茅; 遗传分化; 气候因子; 多元方法; RAPD

中图分类号: Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2008) 05-557-08

## An Analysis of Genetic Differentiation and Distribution of RAPD Polymorphism in *Stipa grandis* (Gramineae) Populations

ZHAO Nian-Xi, GAO Yu-Bao\*\*, WANG Jin-Long

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** The genetic differentiation and RAPD polymorphism of 90 *Stipa grandis* individuals from five populations were studied using RAPD markers. Sixteen oligonucleotide primers were used to amplify 310 RAPD loci, which were analyzed using several multivariate methods. The Principal Coordinated Analysis (PCoA) clearly clustered 90 *Stipa grandis* individuals into five groups in 3-dimension plot and the individuals from the same population were clustered into one group, even though the first three coordinates explained only 21.91% of the total variance. The Canonical Discriminant Analysis could cluster individuals into their corresponding populations, with 97.8% of the correctness. The Spearman Rank Correlation and Multiple Regression Analysis established a strong and significant association between some of the RAPD loci and certain climatic factors (annual precipitation, 10 cumulative temperature in a year, annual mean temperature, mean temperature in January and mean temperature in July). All these results indicated that (1) the genetic differentiation of *Stipa grandis* populations was significant, (2) the RAPD polymorphism was not randomly distributed but associated with the climatic characters of habitats, and (3) the natural selection of climatic divergence played an important role in affecting the genetic diversity and genetic structure of *Stipa grandis* populations. The results of this study may be useful for guiding the conservation of germplasm of *Stipa grandis*.

**Key words:** *Stipa grandis*; Genetic differentiation; Climatic factor; Multivariate method; RAPD

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2007CB106802), 中国博士后科学基金项目 (20060390672) 和国家自然科学基金 (30800132)

\*\* 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: ybgao@nankai.edu.cn; Tel: 022-23508249

收稿日期: 2007-12-15, 2008-02-15 接受发表

作者简介: 赵念席 (1978-) 女, 主要从事植物种群生态学与种群遗传学研究。E-mail: zhaonianxi@eyou.com

开展建群种优势种遗传多样性和遗传变异的研究,不仅有助于了解物种的进化和适应潜力,对这些物种的利用和保护有重要的意义,而且还可以对生态系统遗传健康(ecosystem's genetic health)评价提供基础数据(Gustafson等,1999)。以大针茅(*Stipa grandis* P. Smirn)为建群种的大针茅草原,是欧亚草原区中部特有的一种丛生禾草草原,是我国典型草原的代表群系,在划分草原植被地带时具有标志作用(卢生莲和吴珍兰,1996)。近半个世纪,由于人为利用的加剧,大针茅草原退化已经变得非常严重,即使是在大针茅分布的中心区域都出现了种群的不连续分布。基于大针茅在中国北方草原的重要性,近年来对大针茅遗传多样性的研究越来越多。张红梅等(2003)和赵念席等(2004)利用RAPD分子标记技术先后对内蒙古地区大针茅居群的遗传分化进行了研究,结果均表明大针茅居群的特有位点与居群所在地理位置分布范围相关。珊丹等(2006)利用ISSR分子标记研究了牧压梯度下大针茅群体遗传多样性的变化和居群分化,发现大针茅居群内的遗传多样性指数(Shannon's和Nei's多样性指数)随着放牧压力的增加有逐渐减弱的趋势。赵念席等(2006)研究发现,内蒙古中东部大针茅居群RAPD基因多样性与温度因子之间存在显著或极显著的相关关系。但上述研究所涉及的基本上是居群水平的平均遗传特性,没有涉及居群内个体间的遗传关系,也没有涉及所得到扩增位点的多态性在居群间的分布规律,这些方面研究的空缺,使得我们对大针茅居群遗传结构的认识受到了限制。在前人的研究中,不仅发现了物种的遗传多样性与气候、土壤等生态因子之间存在显著的相关关系,并证明了位点(等位酶或以DNA为基础的分子标记)分布的不均匀性(Nevo等,1998; Fahima等,1999; Li等,2001; Volis等,2001)。

在以往研究的基础上,本文借助多元分析方法,深入分析大针茅不同地理居群内个体之间的相关关系,居群间以及居群内的分化程度,并进一步分析了各个位点在居群间遗传多样性的差异是否与所在生态因子之间差异存在显著的相关关系,以期较全面地认识大针茅居群的遗传分化程度以及分化规律提供实验数据,为进一步确定

影响大针茅居群遗传结构的决定因子提供依据,所得结果也将会为大针茅居群和群落保护的具体实施提供科学证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

我们对锡林郭勒盟地区大针茅分布的典型地段进行了随机采样,共采集5个居群:中国科学院内蒙古草原生态系统定位研究站大针茅样地居群(简称大针茅样地居群),嘎松山居群,锡林浩特西居群,锡林浩特东居群和巴彦乌拉居群。在选定样地50 m × 50 m范围内,以株丛为单位(株丛间隔 > 1 m)随机采集大针茅植株叶片,各个居群的位置、土壤和气候特征以及实验所用大针茅个体数详见表1。所取样品均为新鲜叶片,在野外用硅胶迅速干燥保存,带回实验室于室温下保存备用(钱韦等,2000)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取 大针茅基因组DNA的提取、纯化以及检测方法同赵念席等(2004,2006)。

1.2.2 RAPD扩增与判读 RAPD扩增程序参考Williams等(1990)略作修改,同赵念席等(2004,2006)。随机引物为Operon公司的10碱基寡聚核苷酸,经筛选共16个引物用于正式扩增,它们分别是:OpA01, OpA02, OpA04, OpA08, OpI03, OpI07, OpN02, OpN04, OpN08, OpN09, OpN20, OpQ01, OpQ05, OpQ09, OpQ12和OpQ18。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离(含1 μg/μl溴化乙锭),紫外投射仪上观察,拍照记录。为保证结果的可靠性,每个引物扩增两次。

以标准分子量标记(鼎国生物生产的SD005)为对照,在凝胶成像系统Bio IMAGING SYSTEM (SynGENE)对扩增结果进行分析。比较同一引物全部个体的扩增结果,具有不同相对迁移距离的条带称作不同的RAPD标记,而相对迁移距离相同的条带则为同一RAPD标记。判读每个点样孔的扩增结果,RAPD标记以1(有)或0(无)表示,统计分子量为400~2000bp的清晰谱带;所得数据输入计算机进行统计分析。

1.2.3 数据处理 将RAPD扩增所得数据矩阵命名为DATA SET-1,其中,DATA SET-1包括90 × 310数据矩阵(90行代表所有的个体数;310列代表RAPD扩增位点数),利用POPGENE 32软件中dominant(显性)-diploid(二倍体)对DATA SET-1进行分析,计算得到每个位点在不同居群内的Nei's基因多样性指数,并将所得数据命名为DATA SET-2,其中DATA SET-2包括5 × 310数据矩阵(5行代表居群数;310行代表RAPD扩增位点数)。Nei's基因多样性指数的计算是在两个假设的前提下进行

表 1 5 个大针茅居群的地理和气候 (1965 - 1995 年测定平均值) 数据

Table 1 Geographic and climatic data (means of 30 years between 1965 and 1995) for 5 populations of *Stipa grandis*

居群名称 * Population name	地理位置 Geographic location	海拔高度 Altitude (m)	土壤类型 Soil type	年降水量 Annual precipitation (mm)	10 年累积温 10 cumulative temperature in a year ( )	年均温 Annual mean temperature ( )	一月份均温 Mean temperature in January ( )	七月份均温 Mean temperature in July ( )	个体数 Number of individuals
大针茅样地居群 <i>S. grandis</i> Plot	43.54°N, 116.55°E	1170	栗钙土	340	2136	2	-22.3	18.8	18
嘎松山居群 Gasong Mountain	43.5°N, 116.82°E	1300	暗栗钙土	400	1776	-0.8	-27	17.8	18
锡林浩特西居群 West Xilinhot	43.93°N, 115.74°E	1152	栗钙土	290	2496	1.8	-19.8	20.8	18
锡林浩特东居群 East Xilinhot	44.14°N, 116.36°E	1121	栗钙土	300	2400	1.4	-19.1	20.7	18
巴彦乌拉居群 Bayanwula	44.64°N, 117.72°E	1152	暗栗钙土	340	2256	1.5	-19.4	19.5	18

\* 大针茅样地居群：位于中国科学院内蒙古草原生态系统定位研究站的大针茅样地；嘎松山居群：位于中国科学院内蒙古草原生态系统定位研究站附近的嘎松山阳坡；锡林浩特西居群：位于内蒙古锡林浩特市西 35 km；锡林浩特东居群：位于内蒙古锡林浩特市东 27 km；巴彦乌拉居群：位于内蒙古西乌珠穆沁旗巴彦乌拉镇东北 12 km。

\* *S. grandis* Plot: the *S. grandis* Plot at Inner Mongolia Grassland Ecosystem Research Station of the Chinese Academy of Sciences; Gasong Mountain population: the open slope of the Gasong Mountain near Inner Mongolia Grassland Ecosystem Research Station of the Chinese Academy of Sciences; West Xilinhot population: 35 km west to Xilinhot City; East Xilinhot population: 27 km east to Xilinhot City; Bayanwula population: 12 km northeast to Bayanwula Town of Xiwu Banner of Inner Mongolia.

的：(a) 每个位点都是由两个等位基因位点的其中之一组成；(b) 所有的居群都处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下。

我们用 4 种多元分析的方法对所得数据进行分析，其中，主轴法分析由 NTSYS-pc 软件 (Rohlf, 1998) 完成，而其它 3 种分析方法由 SPSS 软件 (卢文岱, 2004) 完成。

(1) 主轴法分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA) (Gower, 1966)：主轴法是在不考虑个体来源的前提下，能全面调查个体间的遗传变异及其内在关联程度的一种方法，其作用对象为对称数据矩阵。为了全面地了解大针茅个体间的遗传关系，基于扩增数据 (DATA SET-1) 计算个体间的 Jaccard's (Jaccard, 1908) 遗传相似性系数，利用主轴分析的方法构建个体间的关系图，并以此研究居群间的遗传关系。

(2) 判别分析法 (Discriminant Analysis) (Fisher, 1936)：判别分析是将多个观测对象分到预想的类群内的一种多元分析方法。其中的典范判别分析 (Canonical Discriminant Analysis) 判定如何最好地将个体分到已知的一群。我们利用逐步典范判别分析对 RAPD 扩增结果 (DATA SET-1) 进行筛选，得到一组最优的 RAPD 位点组合，能够在二维空间内将所有居群分开。RAPD 位点的选择或去除基于协方差分析  $F$  检验的显著性水平。

(3) Spearman 秩相关分析 (Spearman Rank Correlation)：利用 Spearman 秩相关分析法来检测 DATA SET-2 中 Nei's 遗传多样性与气候因子之间的相关关系，并作显著性检验。

(4) 逐步多元回归分析 (Stepwise Multiple Regression Analysis)：利用逐步多元回归分析可以分析气候因子中对大针茅遗传多样性影响起重要作用的一个或几个指标。在逐步多元回归分析中，DATA SET-2 所得到的不同大针茅居群 RAPD 位点的 Nei's 基因多样性指数作为因变量，气候因子作为自变量。

## 2 结果与分析

### 2.1 主轴法分析

基于 DATA SET-1 计算所得到的大针茅个体间的 Jaccard's 遗传相似性系数，利用主轴分析的方法构建了 5 个居群 90 个个体之间的遗传关系 (图 1)，结果发现来源于同一居群的个体组成单独的一组，且在三维坐标下，来源于不同居群的个体没有出现重叠的现象。第一轴解释了总变异的 8.81%，它能够将巴彦乌拉居群与其它四个居群分开；第二轴解释了总变异的 7.30%，能够将剩余的四个居群分为两组，锡林浩特东和锡林浩特西居群为一组，嘎松山居群和大针茅样地居群为另一组；第三轴解释了总变异的 5.80%，能够将锡林浩特西居群与锡林浩特东居群分开，也能够将大针茅样地居群与嘎松山居群分开。前

三个轴只解释了总变异的 21.91%，却将 5 个居群完全分开，这一结果表明大针茅居群之间存在高的遗传分化。

## 2.2 判别分析

基于不同个体 RAPD 扩增的有无 (DATA SET-1)，利用判别分析成功地将 90 个大针茅个体按居群来源进行分类。本论文利用逐步判别程序对 DATA SET-1 进行分析，共得到 35 个 RAPD 位点作为 5 个居群的最佳分化因子 (数据未列出)。基于筛选出的 35 个 RAPD 位点，将 90 个个体按生境来源进行分类的正确率为 97.8% (表 2)，而在 STEPDISC 过程中被剔除的 RAPD 位点对提高分类的正确率影响并不大。图 2 显示，CAN-1 和 CAN-2 能将 90 个个体按居群来源清晰的分开，且  $F$  检验的结果显示不同居群来源的

个体之间 RAPD 位点的差异是极显著的。

## 2.3 Nei s 基因多样性与气候因子的 Spearman 秩相关分析

利用 Spearman 秩相关分析分析每个位点的 Nei s 基因多样性指数 (DATA-SET2) 与气候因子之间的相关关系，结果表明大针茅居群扩增所得位点受气候因子的影响显著：在 310 个 RAPD 扩增位点中，56 个位点 (占总位点数的 18.06%) 与至少一个气候因子之间存在显著的相关关系 (表 3)；其中 21, 19, 14, 19 和 19 个位点分别与年降水量 (Pn), 10 年积温 (Ta), 年均温 (Tm), 1 月份均温 (T<sub>Jan</sub>) 和 7 月份均温 (T<sub>Jul</sub>) 之间存在显著的相关关系；另外，我们还发现在选出的与气候因子显著相关的位点中，多数位点与年降水量 (Pn) 之间存在显著的正相关 (61.90%)，

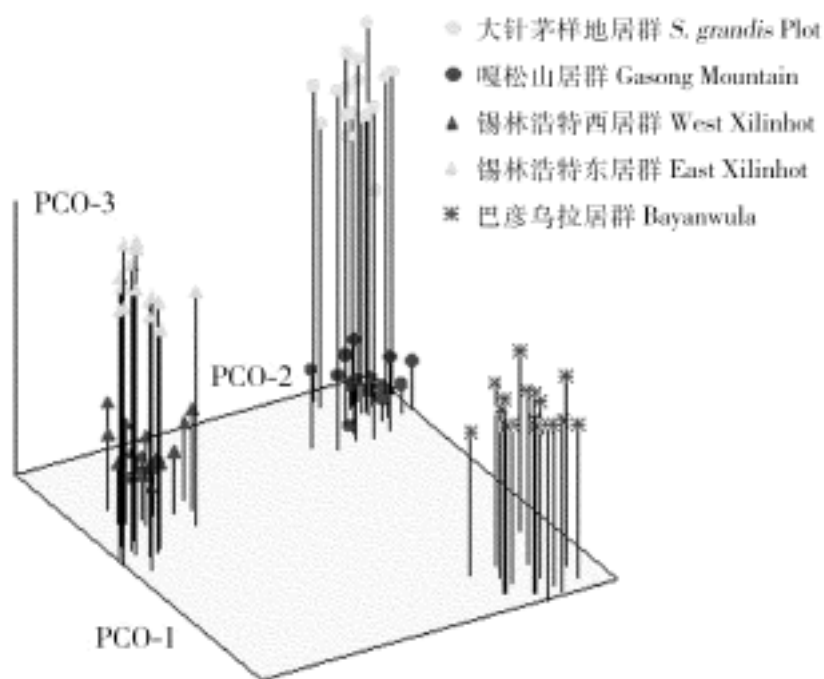


图 1 大针茅 5 居群 90 个个体主轴法分析的三维图

Fig. 1 Differentiation of 90 individuals from five *S. grandis* populations by three-dimensional principal coordinate analysis (PCoA)

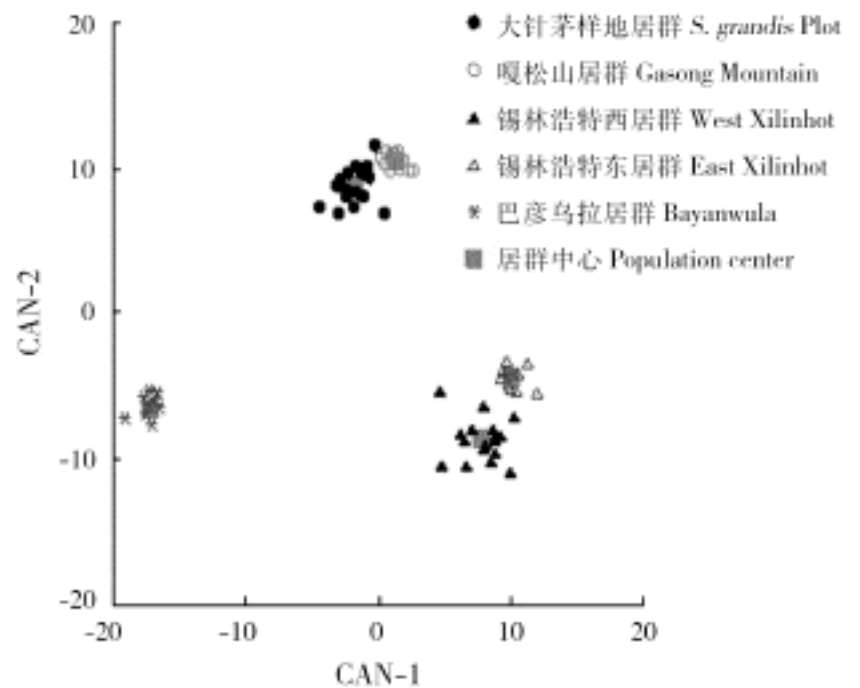


图 2 基于所选择的 35 个 RAPD 位点进行典范判别分析所得的二维图

Fig. 2 Plot of canonical discriminant functions 1 and 2 based on 35 selected RAPD sites

表 2 基于 35 个 RAPD 位点对 5 个大针茅居群进行判别分析的分类结果

Table 2 Classification results of discriminant analysis based on 35 selected RAPD sites

居群名称 Population name	个体总数 Total	预测组成员 Predicted Group Membership				
		大针茅样地居群 <i>S. grandis</i> Plot	嘎松山居群 Gasong Mountain	锡林浩特西居群 West Xilinhot	锡林浩特东居群 East Xilinhot	巴彦乌拉居群 Bayanwula
大针茅样地居群 <i>S. grandis</i> Plot	18	18	0	0	0	0
嘎松山居群 Gasong Mountain	18	0	18	0	0	0
锡林浩特西居群 West Xilinhot	18	1	0	16	0	1
锡林浩特东居群 East Xilinhot	18	0	0	0	18	0
巴彦乌拉居群 Bayanwula	18	0	0	0	0	18

88 个个体 (97.8%) 被正确的归类; 88 individuals (97.8%) were correctly classified.

表 3 RAPD 位点的 Nei s 基因多样性与年降水量、10 年积温、年均温、一月份均温和七月份均温之间的 Spearman 秩相关分析 (表中仅列出显著性相关的结果)

Table 3 Spearman rank correlation coefficients of Nei s gene diversity of each loci with annual precipitation, 10 cumulative temperature in a year, annual mean temperature, mean temperature in January and mean temperature in July (only significant correlations were included in the Table)

位点 Locus	年降水量 Pn	10 年积温 Ta	年均温 Tm	1 月份均温 T <sub>Jan</sub>	7 月份均温 T <sub>Jul</sub>	位点 Locus	年降水量 Pn	10 年积温 Ta	年均温 Tm	1 月份均温 T <sub>Jan</sub>	7 月份均温 T <sub>Jul</sub>
A01-16		-0.894 *		-0.894 *	-0.894 *	N04-4	0.947 *				
A01-17		-0.894 *		-0.894 *	-0.894 *	N04-6	-0.975 **	0.900 *			0.900 *
A01-18		-0.894 *		-0.894 *	-0.894 *	N04-8			0.894 *		
A02-2	0.947 *	-0.975 **			-0.975 **	N04-13				-1.000 **	
A02-4	0.921 *					N08-4				0.975 **	
A02-9			0.900 *			N08-6	-0.975 **	0.900 *			0.900 *
A04-1	0.947 *					N08-11	-0.921 *	0.975 **			0.975 **
A04-3		-0.894 *		-0.894 *	-0.894 *	N08-17			-1.000 **		
A04-5	0.921 *	-0.975 **			-0.975 **	N09-5	-0.921 *				
A04-12		-0.900 *			-0.900 *	N09-15	0.892 *				
A04-13				-0.975 **		N09-18		0.900 *			0.900 *
A04-19			0.949 *			N20-1				0.894 *	
A08-2	-0.892 *					N20-7				0.975 **	
A08-12			-1.000 **			N20-12	0.947 *	-0.975 **			-0.975 **
A08-17			-0.900 *			N20-13			0.975 **		
A08-20				-1.000 **		N20-14				-0.900 *	
I03-4				-0.975 **		N20-20	0.975 **	-1.000 **			-1.000 **
I03-9	0.921 *					Q01-4			-0.894 *		
I03-11	0.975 **	-1.000 **			-1.000 **	Q01-11	0.947 *				
I03-14	0.975 **	-1.000 **			-1.000 **	Q05-1			0.894 *		
I07-1		0.900 *		0.900 *	0.900 *	Q05-10				-0.949 *	
I07-7	-0.921 *					Q05-12			-0.894 *		
I07-9				-0.900 *		Q09-6		0.894 *		0.894 *	0.894 *
I07-12				-0.900 *		Q09-10				0.975 **	
I07-18					-0.900 *	Q09-12			-0.949 *		
N02-3	0.892 *	-0.949 *			-0.947 *	Q09-16			-0.894 *		
N02-7	-0.892 *					Q12-4	-0.921 *	0.975 **			0.975 **
N02-16					0.900 *	Q12-12			-0.900 *		

\*, \*\*: 分别表示在 0.05 和 0.01 显著水平 Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

Pn: Annual precipitation; Ta: 10 cumulative temperature in a year; Tm: Annual mean temperature; T<sub>Jan</sub>: Mean temperature in January; T<sub>Jul</sub>: Mean temperature in July

而与温度因子之间存在显著的负相关, 它们的比例分别为 63.16% (10 年积温 (Ta)), 64.29% (年均温 (Tm)), 63.16% (一月份均温 (T<sub>Jan</sub>)) 和 63.16% (七月份均温 (T<sub>Jul</sub>))。

#### 2.4 逐步多元回归分析

利用逐步多元回归分析来构建各种气候因子对大针茅遗传多样性的影响, DATA SET-2 中大针茅不同位点 Nei s 基因多样性指标作为因变量, 年降水量 (Pn), 10 年积温 (Ta), 年均温 (Tm), 一月份均温 (T<sub>Jan</sub>) 和七月份均温 (T<sub>Jul</sub>) 作为自变量, 经过多次剔除步骤后, 结果表明 65 个位点 (占总位点数的 20.97%) 的基因多样性变异能够由 1 个至 3 个气候因子很好地解释且达到显著水平 (表 4); 这一结果表明不同大针

茅居群 Nei s 遗传多样性的变异是可以由气候因子很好地解释的, 且能够构建显著性方程的比例 (20.97%) 远远超过随机期望的水平 (5%) (Binomial test,  $P < 0.01$ ; Aiken, 1955)。

### 3 讨论

近几十年来, 随着分子生物学技术的发展, 越来越多的分子标记技术用于物种遗传多样性和遗传分化的研究, 如同工酶技术、RFLPs 以及以 PCR 为基础的 RAPD, AFLP, SSR 等。在分子标记出现早期, 分子标记所得某一特定位点的遗传变异与当地环境因子之间的适应相关曾被一度质疑, 但随着以 DNA 为基础的分子标记的广泛应用, 这一问题又被重新考虑 (Pérez de la Vega, 1996)。

表4 5个大针茅居群 RAPD 位点的 Nei s 基因多样性与气候因子 (作为自变量) 之间的多元逐步回归系数 (表中仅列出显著性相关的结果)

Table 4 Coefficients of multiple regression ( $R^2$ ) of Nei s genetic diversity of each loci and climatic variables (as independent variables) in the five *S. grandis* populations (only significant correlations were included in the Table)

位点 Locus	指标 Variable	$R^2$	P 值 P-value	位点 Locus	指标 Variable	$R^2$	P 值 P-value	位点 Locus	指标 Variable	$R^2$	P 值 P-value
A01-4	Pn, Ta, T <sub>Jul</sub>	1.000	0.029	I03-9	Pn	0.779	0.047	N09-15	Pn, Ta, Tm	1.000	0.041
A01-16	T <sub>Jan</sub>	0.922	0.010	I03-11	T <sub>Jul</sub>	0.848	0.026	N20-6	Pn	0.866	0.022
	T <sub>Jan</sub> , Tm	0.999	0.005	I03-14	T <sub>Jul</sub>	0.932	0.008	N20-7	T <sub>Jan</sub> , Tm	0.998	0.003
A01-17	T <sub>Jan</sub>	0.934	0.007		T <sub>Jul</sub> , Tm, Ta	1.000	0.006	N20-12	T <sub>Jul</sub>	0.982	0.001
A01-18	T <sub>Jan</sub>	0.893	0.015	I03-16	Tm	0.904	0.013		T <sub>Jul</sub> , Pn	1.000	0.013
A01-20	Tm	0.959	0.004	I07-1	T <sub>Jan</sub>	0.919	0.010		T <sub>Jul</sub> , Pn, Tm	1.000	0.003
A02-2	T <sub>Jul</sub>	0.885	0.017	I07-3	T <sub>Jul</sub>	0.849	0.026	Q01-9	Tm	0.771	0.050
A02-4	Tm	0.906	0.013	I07-7	Pn, T <sub>Jan</sub>	0.974	0.050	Q01-11	T <sub>Jul</sub>	0.895	0.015
A02-8	T <sub>Jan</sub>	0.838	0.029	I07-14	Tm	0.902	0.013	Q01-13	T <sub>Jan</sub>	0.835	0.030
A02-12	Tm	0.776	0.048	N02-1	Tm	0.956	0.004	Q05-4	T <sub>Jul</sub>	0.853	0.025
A02-14	Pn, Ta	0.994	0.009		Tm, T <sub>Jan</sub>	0.996	0.050		T <sub>Jul</sub> , Tm	0.997	0.012
A04-1	Pn	0.945	0.006	N02-3	T <sub>Jul</sub>	0.921	0.010	Q05-7	Tm	0.801	0.040
	Pn, T <sub>Jul</sub>	1.000	0.015		T <sub>Jul</sub> , Pn	0.997	0.021	Q05-10	T <sub>Jan</sub>	0.905	0.013
A04-3	T <sub>Jan</sub>	0.992	0.000	N02-7	T <sub>Jul</sub>	0.771	0.050	Q05-11	Tm	0.949	0.005
A04-4	Tm	0.956	0.004	N02-17	Pn	0.810	0.037	Q05-12	Tm	0.774	0.049
	Tm, T <sub>Jan</sub>	0.996	0.050		Pn, Ta, Tm	1.000	0.050	Q09-5	Tm	0.851	0.025
A04-5	Ta	0.924	0.009	N04-4	Pn	0.920	0.010	Q09-6	Tm	0.934	0.007
A04-10	Tm	0.791	0.043	N04-6	Pn	0.902	0.013		Tm, T <sub>Jan</sub>	0.998	0.016
A04-12	T <sub>Jul</sub>	0.783	0.046	N08-4	T <sub>Jan</sub>	0.917	0.010	Q09-16	Tm	0.974	0.002
A04-13	T <sub>Jan</sub>	0.980	0.001	N08-5	T <sub>Jan</sub>	0.849	0.026	Q12-4	T <sub>Jul</sub>	0.840	0.029
A04-15	Pn	0.883	0.018	N08-6	Pn	0.917	0.010		T <sub>Jul</sub> , T <sub>Jan</sub>	0.996	0.013
A04-18	T <sub>Jan</sub>	0.805	0.039		Pn, Tm	0.993	0.046		T <sub>Jul</sub> , T <sub>Jan</sub> , Ta	1.000	0.018
A04-20	Tm	0.928	0.008	N08-7	T <sub>Jan</sub>	0.933	0.007	Q12-10	T <sub>Jul</sub>	0.833	0.031
A08-2	Pn, Ta	0.995	0.008	N08-11	T <sub>Jul</sub>	0.920	0.010		T <sub>Jul</sub> , T <sub>Jan</sub> , Ta	1.000	0.005
	Pn, Ta, T <sub>Jan</sub>	1.000	0.040		T <sub>Jul</sub> , Tm, Ta	1.000	0.024	Q12-19	Pn, Ta, T <sub>Jul</sub>	1.000	0.000
A08-20	T <sub>Jan</sub>	0.848	0.026	N08-13	T <sub>Jan</sub> , Tm, Pn	1.000	0.032	Q18-9	Tm	0.929	0.008
	T <sub>Jan</sub> , Tm	0.998	0.008	N09-4	Pn	0.831	0.031	Q18-10	Tm	0.924	0.009
I03-4	T <sub>Jan</sub> , Tm	0.992	0.015	N09-12	Pn	0.779	0.047				

Pn: Annual precipitation; Ta: 10 cumulative temperature in a year; Tm: Annual mean temperature; T<sub>Jan</sub>: Mean temperature in January; T<sub>Jul</sub>: Mean temperature in July

而事实上, 在自然界中物种的遗传多样性的非随机分布, 即基于 DNA 水平的遗传多样性与生态地理参数的相关关系在一些物种中已逐渐被证实并揭示了“适应性变异的存在”, 且这方面的研究已在种质资源保护研究中被广泛接受和利用。如: 以色列 Haifa 大学进化研究所的研究人员, 对生境来源不同的野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*) 的遗传多样性与当地地形、土壤、气候等生态环境因子的相关性进行研究 (Nevo and Beiles, 1988; Nevo 等, 1991; Li 等, 1999, 2000; Fahima 等, 1999, 2002), 所用分子标记包括等位酶技术、RAPD 技术和 SSR 技术。经过深入细致的分析得出野生二粒小麦分子标记位点的分布模式是非随机的, 所得位点与当地气候和土壤等生态地理因子之间存在显著的相关关系, 表现出对

当地生境的适应, 即受当地环境差异的影响显著, 属于适应性变异; 并且还对另一重要的野生资源野大麦 (*Hordeum spontaneum*) 的遗传多样性分布展开深入研究 (Brown 等, 1980; Nevo 等, 1979, 1986, 1998; Turpeinen 等, 2001), 结果发现野大麦高的遗传多样性与热或冷的环境梯度相联系的; 位点 (包括等位酶位点, RAPD 位点, SSR 位点和 LP-PCR 位点) 的频率与生态地理因子显著相关, 所有这些数据都表明: 野大麦在 DNA 水平上的位点分布是非随机的, 气候胁迫和生境异质性的自然选择作用是决定该物种遗传多样性分布的主要原因; Semagn 等 (2000) 利用 RAPD 分子标记对十蕊商陆 (*Phytolacca dodecandra*) 的遗传多样性进行研究, 相关分析和回归分析的结果显示, 虽然多数位点的变异要由不同

生态因子的结合才能很好的解释，但仍有高比例 (>5%) 的 RAPD 位点与海拔、温度和降水之间表现出显著的关联性，这些结果表明环境选择对十蕊商陆居群的遗传变异起作用，部分 RAPD 位点的多态性可以被认为是适应性的。在本研究中，Spearman 秩相关分析表明不同地理居群的大针茅，其 18.06% 的 RAPD 扩增位点 (56 个位点，表 3) 的 Nei's 遗传多样性与所在生境的一个或几个气候因子之间存在显著的相关关系，且与气候因子显著相关的位点中，多数与年降水量之间存在显著的正相关关系而与温度因子之间存在显著的负相关关系。进一步多元逐步回归分析表明，本研究所观测的不同地理居群大针茅 RAPD 扩增位点的基因多样性与本文所选的降水和温度具有显著的关联性。两种分析所得的显著性位点分别占总位点的 18.06% (Spearman 秩相关分析) 和 20.97% (多元逐步回归分析)，均远远超过随机期望的水平 (5%)。植物的某一性状与环境因子的相关性是检测自然选择对植物分化起作用的最常见和最古老的方法之一。虽然现在我们都知，这种相关性并不能很好的反映出环境因子差异与性状差异之间的因果 (cause-and-effect) 关系，但是可以对哪种环境因子参与了某种性状的选择进程进行推断 (Semagn 等, 2000)。本文研究结果初步表明大针茅的遗传多样性与气候因子之间存在一定的相关关系，也从侧面表明了不同地理大针茅居群的遗传多样性是非随机分布的，暗示了大针茅在 DNA 水平上对不同生境的适应性变异的存在。正如 Pérez de la Vega 等 (1996) 指出的那样：DNA 水平上一定比例变异可以被认为是适应性的，而不是严格中性的。

用主轴法分析大针茅个体间的遗传关系和居群间遗传分化，充分证明了来源于同一居群的个体具有最高的相似性，分为一个亚群；居群间的遗传分化是极显著的。在本研究中我们还发现，RAPD 分子标记在分辨大针茅基因型方面是有效的。利用判别分析，大针茅 90 个个体中的 97.8% 能够将个体按居群来源正确的进行分类，这一结果也暗示出大针茅居群的遗传分化极显著，且遗传结构受居群所在生境的一个或几个生境因子影响显著，对居群的分化起决定作用。在预测物种遗传分化是否是由自然选择引起时，判

别分析十分有效。当物种的遗传分化是由环境的选择作用引起时，通过判别分析能够很容易地将个体基因型按生境来源或者环境梯度正确的进行分类，且准确率都很高。Fahima 等 (1999) 在利用判别分析对野生二粒小麦进行分类时，发现按地理分布将个体基因型进行分类的正确率为 95.5%；Semagn 等 (2000) 将十蕊商陆基因型按海拔高度进行分类的正确率为 92.8%。这些结果都为所研究物种的遗传分化受自然选择影响显著提供了有力的证据。

本研究用更多的实验证据证明大针茅居群间存在强烈的遗传分化且生境间水热差异的自然选择引起了大针茅居群 RAPD 分子标记的生态地理分化，与赵念席等 (2006) 先前分析居群综合数据所得的结论相一致。本研究表明 RAPD 分子标记在检测大针茅遗传多样性方面非常有用，且本文所得结果——RAPD 位点在居群内的遗传多样性与气候因子之间存在显著的相关关系，可以为大针茅种质资源的保护提供理论依据。

## 【参 考 文 献】

- Aiken HH, 1955. Tables of the Cumulative Binomial Probability Distribution [M]. Cambridge, MA: Harvard University Press
- Brown ADH, Feldman MW, Nevo E, 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum* [J]. *Genetics*, **96**: 523—536
- Fahima T, Sun GL, Beharav A *et al.*, 1999. RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel [J]. *Theor Appl Genet*, **98**: 434—447
- Fahima T, Roder MS, Wendehake K *et al.*, 2002. Microsatellite polymorphism in natural populations of wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel [J]. *Theor Appl Genet*, **104**: 17—29
- Fisher RA, 1936. The use of multiple measurement in taxonomic problems [J]. *Ann Eugen*, **7**: 179—188
- Gustafson DJ, Gibson DJ, Nickrent DL, 1999. Random amplified polymorphic DNA variation among remnant big bluestem (*Andropogon gerardii* vitman) populations from Arkansas Grand Prairie [J]. *Mol Ecol*, **8**: 1693—1701
- Gower JC, 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis [J]. *Biometrika*, **53**: 325—338
- Jaccard P, 1908. Nouvelles recherches sur la distribution floral [J]. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, **44**: 223—270
- Li YC, Fahima T, Beiles A *et al.*, 1999. Microclimatic stress and adaptive DNA differentiation in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides* [J]. *Theor Appl Genet*, **98**: 873—883

- Li YC, Krugman T, Fahima T *et al.*, 2001 . Spatiotemporal allozyme divergence caused by aridity stress in a natural population of wild wheat, *Triticum dicoccoides*, at the Ammiad microsite, Israel [J] . *Theor Appl Genet*, **102**: 853—864
- Li YC, R der MS, Fahima T *et al.*, 2000 . Natural selection causing microsatellite divergence in wild emmer wheat at the ecologically variable microsite at Ammiad, Israel [J] . *Theor Appl Genet*, **100**: 985—999
- Lu SL (卢生莲), Wu ZL (吴珍兰), 1996 . On geographical distribution of the genus *Stipa* L . in China [J] . *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **34**: 242—253
- Lu WD (卢文岱), 2004 . SPSS for Windows [M] . Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 134—370
- Nevo E, Zohary D, Brown AHD *et al.*, 1979 . Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Israel [J] . *Evolution*, **33**: 421—455
- Nevo E, Beiles A, Kaplan D *et al.*, 1986 . Natural selection of allozyme polymorphisms: a microsite test revealing ecological genetic differentiation in wild barley [J] . *Evolution*, **40**: 13—20
- Nevo E, Beiles A, 1988 . Genetic parallelism of protein polymorphism in nature: ecological test of the neutral theory of molecular evolution [J] . *Biol J Linn Soc*, **35**: 229—245
- Nevo E, Noy-Meir I, Beiles A *et al.*, 1991 . Natural selection of allozyme polymorphisms: micro-geographical spatial and temporal ecological differentiations in wild emmer wheat [J] . *Israel J Bot*, **40**: 419—449
- Nevo E, Baum B, Beiles A *et al.*, 1998 . Ecological correlates of RAPD DNA diversity of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent [J] . *Genet Res Crop Evol*, **45**: 151—159
- Pérez de la Vega M, 1996 . Plant genetic adaptedness to climatic and edaphic environment [J] . *Euphytica*, **92**: 27—38
- Qian W (钱韦), Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元), 2000 . Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPD and ISSRs [J] . *Acta Bot Sin* (植物学报), **42**: 741—750
- Rohlf FJ, 1998 . NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02 . Exeter Software, Setauket, NY
- Semagn K, Bjornstad A, Stedje B *et al.*, 2000 . Comparison of multivariate methods for the analysis of genetic resources and adaptation in *Phytolacca dodecandra* using RAPD [J] . *Theor Appl Genet*, **101**: 1145—1154
- Shan D (珊丹), Zhao ML (赵萌莉), Han B (韩冰) *et al.*, 2006 . Genetic diversity of *Stipa grandis* under different grazing pressures [J] . *Acta Ecol Sin* (生态学报), **26**: 3175—3183
- Turpeinen T, Tenhola T, Manninen O *et al.*, 2001 . Microsatellite diversity associated with ecological factors in *Hordeum spontaneum* populations in Israel [J] . *Mol Ecol*, **10**: 1577—1591
- Volis S, Yakubov B, Shulgina I *et al.*, 2001 . Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch . [J] . *Biol J Linn Soc*, **74**: 289—303
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ *et al.*, 1990 . DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J] . *Nucl Acids Res*, **18**: 6531—6535
- Zhang HM (张红梅), Zhao ML (赵萌莉), Li QF (李青丰) *et al.*, 2003 . Detection of genetic diversity of *Stipa grandis* in Inner Mongolia using RAPD markers [J] . *Acta Agrist Sin* (草地学报), **11**(2): 170—178
- Zhao NX (赵念席), Gao YB (高玉葆), Wang JL (王金龙) *et al.*, 2004 . An analysis of genetic differentiation between *Stipa grandis* populations in middle and eastern Inner Mongolia steppe [J] . *Acta Ecol Sin* (生态学报), **24**: 2178—2185
- Zhao NX (赵念席), Gao YB (高玉葆), Wang JL (王金龙) *et al.*, 2006 . RAPD diversity of *Stipa grandis* populations and its association with some ecological factors [J] . *Acta Ecol Sin* (生态学报), **26**: 1312—1319