

用分子标记揭示植物随机大居群中亚居群的遗传结构——茅栗自然居群空间遗传结构的 SSR 分析

王 英 康 明 黄宏文*

(中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘 要 采用微卫星标记对茅栗(*Castanea sequinii*)随机大居群以及其中各亚居群的遗传结构进行了空间自相关分析,以探讨植物自然居群内遗传变异的分布特征及其形成机制。通过 9 对微卫星引物所产生的 119 个多态位点,测定了大别山区域内茅栗居群以及各亚居群的空间自相关系数 Moran's I 值。结果表明:大别山分布的野生茅栗为一个缺乏空间结构的随机大居群,茅栗亚居群之间频繁的花粉流削弱了地理隔离导致的遗传漂变或分化作用在维系居群随机遗传结构中具有的重要作用。但是,在接近亚居群大小的地域范围内(0.228 km)具有一定的空间结构,即小地域尺度中的亚居群存在着空间遗传结构。取样的 3 个亚居群在小格局范围内都存在一定的空间结构,遗传变异基本上呈非随机分布,在短距离内(61 m)3 个亚居群一致表现出不同程度的显著正相关,而随着距离的增加, Moran's I 值虽然在不同亚居群间存在一定差异变化,但是总体而言趋向预期值,即不存在空间结构,说明其遗传变异在亚居群内只是在短距离内形成一定的空间结构。研究认为有限的种子散播以及微生境选择等因素可能是产生这种小格局的遗传结构的主要原因。上述研究结果有助于进一步了解植物随机大居群的进化历史和生态过程,同时也为栗属植物中国特有种的保育策略提供了科学依据。

关键词 茅栗 微卫星 随机大居群 亚居群 居群遗传结构 空间自相关 遗传多样性 基因流

SUBPOPULATION GENETIC STRUCTURE IN A PANMICTIC POPULATION AS REVEALED BY MOLECULAR MARKERS: A CASE STUDY OF *CASTANEA SEQUINII* USING SSR MARKERS

WANG Ying KANG Ming and HUANG Hong-Wen*

(Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract *Castanea squinii*, an endemic tree widely distributed in China, has great value both for chestnut breeding and in natural forest ecosystems. The spatial genetic structure within and among populations is an important part of the evolutionary and ecological genetic dynamics of natural populations and can provide insights into effective conservation of genetic resources. In the present study, the spatial genetic structure of a natural population of *C. sequinii* in the Dabie Mountain region, including three subpopulations, was investigated using SSR markers. Nine prescreened SSR loci generated 29–33 alleles and were used for spatial autocorrelation analysis. Based on Moran's I coefficient, a panmictic population of *C. sequinii* was revealed that lacked spatial genetic structure in the Dabie Mountain region. These results suggested that high pollen flow among subpopulations counteracted genetic drift or genetic differentiation and played an important role in maintaining a random and panmictic population structure in the region. However, spatial genetic structure was detected in the geographic range of each subpopulation's scale (0.228 km) indicating that spatial genetic structure occurred at a fine scale within each subpopulation. All three subpopulations showed significant fine-scale structure. The genetic variation was not randomly distributed within 61 m in each subpopulation (Moran's I positive values). However, although Moran's I values varied among the different subpopulations, Moran's I in all the three subpopulations reached the expected values with an increase in distance suggesting a general patchy distribution in the subpopulations. The fine-scale structure seemed to be influenced by restricted seed dispersal and microenvironment selection. These results have important implications for understanding the evolutionary history and ecological process of natural populations of *C. squinii* and provide baseline data for formulating conservation strategies of *Castanea* species.

收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-04-10

基金项目: 中国科学院知识创新重要方向项目(KSCX2-SW-104)和国家自然科学基金项目(30470185)

张忠慧、陈绪中老师协助野外采样工作,姜正旺、李作洲老师以及刘义飞、史全芬等同学在论文写作和实验过程中提供帮助,谨此致谢

* 通讯作者 Author for correspondence E-mail: hongwen@wbpcas.cn

Key words *Castanea sequinii*, SSR, Panmictic large population, Subpopulation, Genetic structure, Spatial autocorrelation, Genetic diversity, Gene flow

自然居群的空间遗传结构表现为基因频率在居群内和居群间的非随机分布,是居群的生态学过程和遗传学过程相互作用的结果。对居群空间遗传结构的研究是深入理解居群遗传特征及其居群动态变化规律的一项重要内容(Levin & Kerster, 1974; Sokal *et al.*, 1989)。植物居群的空间遗传结构取决于基因流、微生境选择、空间分布模式、生活史和人类活动等因素,但在居群内的小格局尺度上,由于基因流及其相关生态因素所导致的局部家系结构,其中,距离隔离(Isolation by distance)和微生境选择(Microhabitat selection)是形成居群内空间遗传结构最直接的原因(Vekemans & Hardy, 2004)。因此,估测居群内小格局的空间遗传结构有助于探讨物种的繁育系统、基因流动态、遗传漂变、微生境选择及其它干扰因素对居群的影响(Epperson, 1993; Bjornstad *et al.*, 1995)。同时,植物居群空间遗传结构信息也是制定物种保育策略及管理方式的理论基础,对植物遗传资源的保护和管理具有重要指导意义(Epperson, 1992; Williams & Hamrick, 1996)。近年来,居群空间遗传结构分析已经成为分子生态学和保护生物学领域的一个重要研究手段(Escudero *et al.*, 2003)。

空间自相关分析(Spatial autocorrelation analysis)通过检测一个位置上的变异是否依赖于邻近位置的变异来判断该变异是否存在空间自相关,这是一种非常有效的研究居群空间遗传结构的方法(Sokal & Oden, 1978a, 1978b; Epperson, 1990)。目前,对于植物空间遗传结构的研究大多数都是在小格局的水平,如 Cottrell 等(2003)采用 SSR 标记技术对两种橡树(欧洲白栎(*Quercus robur*)和欧洲橡木(*Q. petraea*))的两个不同干扰程度居群的小格局空间遗传结构进行了分析,结果表明这两种橡树在同一居群及同一树种在不同居群均表现出不同的空间遗传结构,揭示出物种不同的种子散布机制和人类活动对居群的空间遗传结构有明显的影响。近年来,也有少数研究是在大的地理格局上研究居群间的空间遗传结构,如 Chung(1996)采用等位酶方法分析了百合科两种植物 *Hosta minor* 和 *H. capitata* 居群间的空间遗传结构,发现 *H. capitata* 在长距离水平上具有明显的空间遗传结构,而 *H. minor* 居群间没有发现与距离有关的空间结构,这可能与物种的不同分布模式和自然生境有关。迄今为止,同时在这两种格

局水平上对植物空间遗传结构的研究却不多见,同时,对栗属植物的空间自相关分析也仅见于欧洲栗(*Castanea sativa*)(Pigliucci *et al.*, 1990)和中国板栗(*C. mollissima*)(李作洲等,2002)在大尺度地理格局上的研究。

茅栗(*C. squinii*)是我国特有的一种壳斗科栗属植物,为二倍体,灌木或小乔木,雌雄同株,风媒异花传粉,种子主要靠重力传播(Rutter *et al.*, 1990)。它广泛分布于山东、河南、山西、陕西和长江流域以南各省区。茅栗作为我国森林生态系统中的一种常见树种具有重要的生态学价值,其果实是许多野生动物的食物来源。它也是中国板栗的近缘种之一,可以作为品种改良的优良亲本,用于板栗和其它食用栗种的遗传育种。我国栗属特有种在世界栗属资源中占有重要位置,但是长期以来对我国丰富的栗属资源重视不够,大量自然、实生板栗林和茅栗林被毁坏或砍伐,致使我国自然栗属资源严重丢失(黄宏文,1998)。开展茅栗自然居群遗传多样性和遗传结构的研究可为茅栗自然资源的保护提供理论依据。该研究以我国大别山区自然分布的茅栗居群为研究对象,采用栗属植物的微卫星分子标记和空间自相关分析方法,将大别山区全境茅栗自然居群作为一个随机分布大居群进行东、中、西 3 个亚居群取样,分析其居群和亚居群的空间遗传结构,目的在于揭示我国特定地域及生态类型中植物居群遗传变异的空间分布格局和动态规律,并探讨其形成原因和维持机制。

1 材料和方法

1.1 取样地点和材料收集

茅栗为我国大别山区广为分布的物种,该研究将大别山全境的茅栗分布视为一个由多个亚居群组成的随机大居群,分别对大别山东段、中段和西段进行亚居群取样。3 个亚居群分别位于大别山东段(安徽省岳西县主簿镇:31°01'N, 116°25'E)、中段(湖北省麻城市龟山风景区:31°04'N, 115°12'E)和西段(湖北省广水市中华山林场:31°41'N, 113°41'E)3 个地理位置,这 3 个地理位置两两之间的距离分别为:岳西到麻城为 118 km,麻城到广水为 137 km,岳西到广水为 248 km。图 1A 为 3 个亚居群的取样示意图。每个地点选取一个相对独立的亚居群,于

2003 年 9 月采集带有休眠芽的枝条，带回实验室用湿报纸包裹 4 ℃ 条件下保存，次年扦插枝条得萌发的幼叶用于 DNA 提取。由于采用冬季扦插枝条上萌发的幼叶提取 DNA，可以获得较高质量的 DNA 模

板用于微卫星分析。各亚居群随机取样，同时用 GPS 定位系统测量其地理坐标，并将各取样植株标定在图上(图 1 a、b、c)。3 个亚居群依据居群现状共采集 197 个样品，各亚居群的取样个数等见表 2。

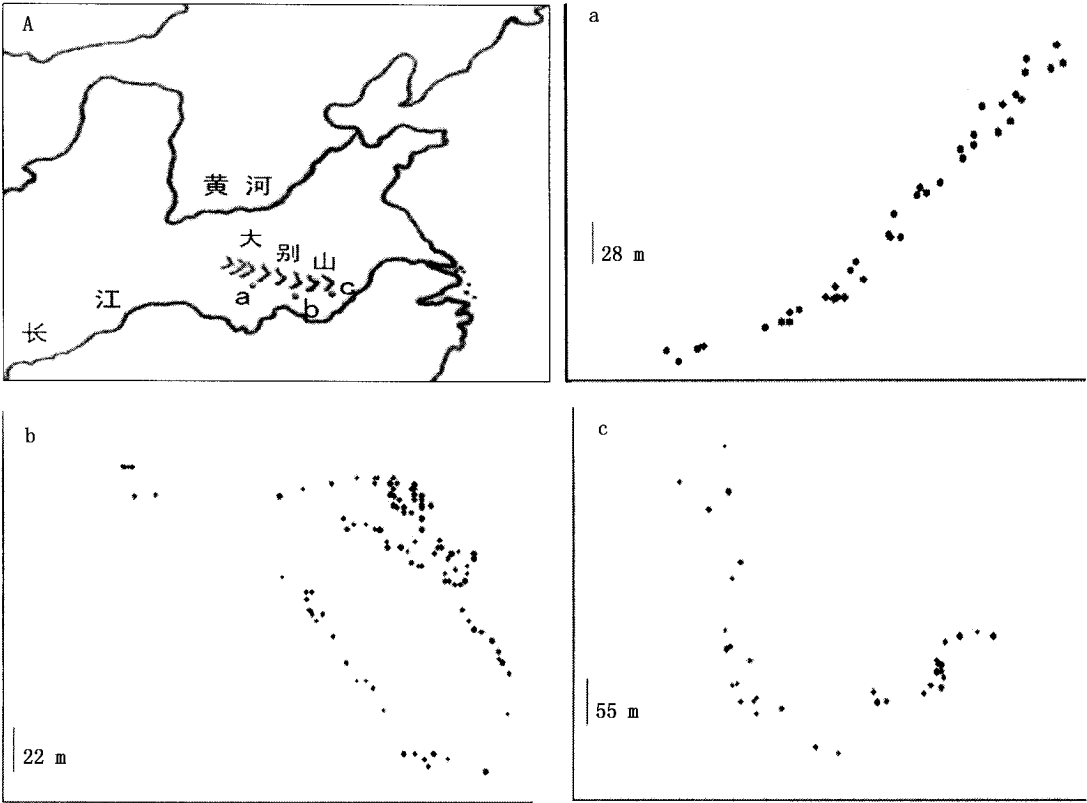


图 1 3 个亚居群的取样示意图(A)及每个亚居群内的个体位置图
Fig.1 The sketch map of 3 subpopulations of *C. sequinii* in China (A) and spatial distribution of individuals within each subpopulation
a.广水 Guangshui b.麻城 Macheng c.岳西 Yuexi

1.2 DNA 提取和微卫星分析

取扦插萌发的幼叶 0.2 g，放入液氮中迅速研磨成粉末，按 Rogers 和 Bendich(1985)的 CTAB 改良法提取植物基因组总 DNA。按 Ausubel 等(1987)的方法，采用 Rnase A 消化除去 RNA。模板 DNA 的质量和浓度采用紫外分光核酸测定仪(GENEQUANT, Eppendorf, Germany)测定，并应用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测确认(λ /Hind III marker)。模板用于微卫星分析时稀释为 25 ng· μ l⁻¹。

根据 Marinoni 等(2003)报道的欧洲栗的微卫星引物，选取其中多态性较好的 14 对引物进行筛选，最后选择条带清晰，重复性好的 9 对引物进行分析，9 对引物序列见表 1。DNA 扩增程序依照 Marinoni 等(2003)报道的方法，扩增反应总体积为 20 μ l 包

括：2 μ l 10 \times buffer(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol·L⁻¹ KCl), 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 引物各 0.5 μ mol·L⁻¹, 200 μ mol·L⁻¹ dNTP, 0.5 U Taq DNA 酶和 50 ng 模板 DNA。样品在以下条件进行扩增：95 ℃ 预变性 5 min，然后每个循环 94 ℃ 50 s，每对引物的特定退火温度 45 s、72 ℃ 90 s 共循环 28 次，最终在 72 ℃ 7 min。扩增反应在 Master Gradient(Eppendorf, Germany)PCR 仪上进行。扩增产物加入等体积变性剂(98% formamide, 10 mmol·L⁻¹ pH 8.0 EDTA, 0.05% bromophenol blue and 0.05% xylene cyanol), 94 ℃ 变性 3 min，然后取 3 μ l 样品在 6% 变性聚丙烯酰胺胶上电泳，电泳缓冲液为 1 \times TBE，电泳在 Sequi-Gen GT System(BIORAD, USA)电泳仪上进行，功率恒定为 65 W，电泳时间约 1.5 h。银染程序参照

表 1 9 对栗属植物微卫星引物所得片段大小范围, 遗传多样性和遗传分化参数以及 Hardy-weinberg 平衡检验
Table 1 List of 9 primers used and size range, genetic diversity and genetic differentiation parameters, and Hardy-weinberg equilibrium test

引物编号 Locus code	片段大小范围 Size range (bp)	等位基因数 No. of alleles	预期杂合度 H_e	观察杂合度 H_o	近交系数 F_{IS}	居群分化系数 F_{ST}	哈迪-温格平衡检验 Hardy-weinberg equilibrium test
CsCAT1	160 ~ 201	19	0.879	0.538	0.359	0.094	NS
CsCAT2	180 ~ 226	13	0.864	0.774	0.034	0.078	NS
CsCAT3	197 ~ 215	6	0.637	0.594	- 0.023	0.089	NS
CsCAT4	217 ~ 261	13	0.818	0.817	- 0.047	0.054	NS
CsCAT5	217 ~ 242	7	0.753	0.607	0.181	0.031	NS
CsCAT7	190 ~ 217	6	0.761	0.538	0.256	0.038	NS
CsCAT8	190 ~ 210	6	0.729	0.658	0.117	0.018	NS
CsCAT14	150 ~ 160	6	0.754	0.770	- 0.151	0.049	NS
CsCAT15	127 ~ 142	12	0.790	0.355	0.436	0.119	NS
平均值 Mean		9.78	0.778	0.625	0.129	0.063	NS

H_e : Expected heterozygosity H_o : Observed heterozygosity F_{IS} : Inbreeding coefficient F_{ST} : Differentiation coefficient NS: 差别不显著 No significance

Sanguinetti 等(1994)报道的程序,略做改动。

1.3 数据分析

1.3.1 遗传多样性

采用 GenALEx 软件(Peakall & Smouse, 2001), 分别计算以下遗传多样性参数: 每个位点等位基因频率, 每个位点平均等位基因数(A), 每个位点平均有效等位基因数(A_e), 观察杂合度(H_o)和预期杂合度(H_e), 每个亚居群的特有等位基因数(A_{pe}), 居群分化系数 Wright's F_{ST} (Workman & Niswander, 1970), Wright's 近交系数 F_{IS} (Weir & Cockerham, 1984), 并采用 Li 和 Horvitz(1953)的方法检验等位基因频率是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡。根据公式 $N_m = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ 计算反映基因流强度的居群每代迁移数(N_m)(Slatkin & Barton, 1989)。

1.3.2 空间自相关分析

通过计算每个位点的 Moran's I 统计值检测空间自相关程度(Sokal & Oden, 1978a, 1978b)。在此我们将微卫星基因频率变异看作绝对型变异。在多态位点中选取基因频率在 10% ~ 90% 的位点, 频率小于 0.1、大于 0.9 的等位基因被排除, 因为它们仅代表非常少的个体, 不能提供足够的信息(Geburek, 1993)。依据每个居群内样本间的距离, 按等样对频率原则划分距离等级, 尽量使每个距离等级内的样对数均匀分布, 随机大居群划分了 10 个距离等级(0.038 ~ 294 km)。各亚居群距离等级划分情况: 广水亚居群划分了 9 个距离等级(27 ~ 288 m); 麻城亚居群划分了 9 个距离等级(27 ~ 298 m); 岳西亚居群划分了 10 个距离等级(32 ~ 393 m)。采用 Saap 4.3 软件(Warternberg, 1989)计算不同距离等级下的空间自相关系数 Moran's I 和其期望值($E_{(1)} = -1/$

$(n - 1)$, n = 位点数)。当检测位点足够多时, $E_{(1)}$ 接近 0。如果 I 值显著大于 I 的期望值(即 I 值为正值且显著), 说明两点存在相似关系; 而 I 值显著小于 I 的期望值(即 I 值为负值且显著), 说明两点存在不相似关系(Robert & Sokal, 1978)。通过统计学检验来判定上述的相似和不相似是否由于随机过程造成的, 从而分析居群在两个不同分布尺度上的空间结构(Sokal & Oden, 1978a, 1978b; McCauley *et al.*, 1996)。

2 结果与分析

2.1 茅栗居群的微卫星分析结果

实验所采用的 9 对引物在茅栗居群全部样本中均扩增出了清晰的谱带, 并且具有很好的重复性, 图 2 为其中一对引物(CsCAT1)扩增出的部分谱带。微卫星标记在茅栗居群中具有很高的多态性, 在 9 个微卫星位点上共扩增出了 88 个等位基因, 平均每个位点的等位基因为 9.78 个, 其中以位点 CsCAT1 的等位基因最多, 为 19 个, 位点 CsCAT3、CsCAT7、CsCAT8 和 CsCAT14 中的等位基因最少, 为 6 个, 各位点的片段长度为 127 ~ 261 bp(表 1)。在随机大居群中, 平均等位基因数 $A = 9.778$, 有效平均等位基因数 $A_e = 4.954$, 观察杂合度为 $H_o = 0.625$, 预期杂合度为 $H_e = 0.776$, 表明大别山全境茅栗自然居群遗传多样性非常高。各亚居群的平均等位基因数 $A = 6.000 \sim 8.444$, 平均有效等位基因数 $A_e = 3.578 \sim 4.537$, 观察杂合度为 $H_o = 0.620 \sim 0.634$, 预期杂合度为 $H_e = 0.704 \sim 0.750$ (表 2), 表明 3 个茅栗亚居群也均具有较高的遗传多样性。各亚居群相比, 每个亚居群的特有等位基因数为 $A_{pe} = 3 \sim 20$, 其中麻

城亚居群特有等位基因数最多为 20 个,广水亚居群最少为 3 个,特有等位基因的存在表明每个亚居群在遗传组成上存在一定的差异。各位点的 $F_{ST} = 0.018 \sim 0.119$, 平均为 0.063, 表明茅栗自然居群各亚居群间的遗传分化很小,大部分的遗传变异位于各亚居群内部(93.7%)。每个亚居群的 Wright's 近交系数 $F_{IS} = 0.104 \sim 0.169$, 3 个亚居群的 F_{IS} 平均值为 0.127, 除位点 CsCAT3、CsCAT4 和 CsCAT14 的 F_{IS} 值小于 0 之外,其余均为正值,经 Hardy-Weinberg 统计检验,所有的位点均未偏离平衡,表明大别山全境茅栗为随机交配居群。居群每代之间的基因流 N_m 值为 3.72, 表明居群间基因交流较频繁,防止了由遗传漂变引起的居群间的遗传分化。

2.2 茅栗自然居群的微卫星变异的空间分布

2.2.1 茅栗自然居群随机大居群的空间遗传结构

对于大别山全境的大居群尺度,从 64 个多态性等位基因中选取了 27 个频率在 10% ~ 90% 之间的等位基因进行空间自相关分析。在统计的 270 个 Moran's I 值中,有 131 个(48.5%)达到显著水平(期望值 $E(I) = -0.038$), 27 个等位基因中累计达显著水平的有 21 个(77.8%)(表 3)。平均 Moran's I 值

在第 1 ~ 4 距离等级内(0.038 ~ 0.228 km)为正值且达显著水平,在第 5 ~ 10 距离等级内(116.286 ~ 293.360 km)为负值,其中在第 6、8、9 距离等级内小于期望值($E(I) = -0.038$),在第 5、10 距离等级内又表现为大于期望值,达显著水平,表明茅栗自然居群在第 1 ~ 4 距离等级(0.038 ~ 0.228 km)内存在一定的空间结构,但是在此范围内, Moran's I 值随距离增加发生的改变不明显,只是在第 1 ~ 3 距离等级内 Moran's I 值随距离增大而减小,在第 3 ~ 4 距离等级内, Moran's I 值不发生改变,均为 0.02。由此可见,茅栗自然大居群在近距离(0.228 km)范围内具有显著但微弱的空间结构,大于此距离多数等位基因则为随机分布的空间模式。遗传变异绝大部分(93.7%)位于各亚居群内部,亚居群之间具有很高的相似性,分化程度很小。另外, 3 个亚居群的 Wright's 近交系数 F_{IS} , 除位点 CsCAT3、CsCAT4 和 CsCAT14 的值小于 0 之外,其余均为正值,经 Hardy-Weinberg 统计计算,所有的位点均未偏离平衡,说明大别山茅栗自然大居群为一随机交配、等位基因均匀分布的居群。图 3 为随机大居群平均 Moran's I 值的空间自相关模式图。

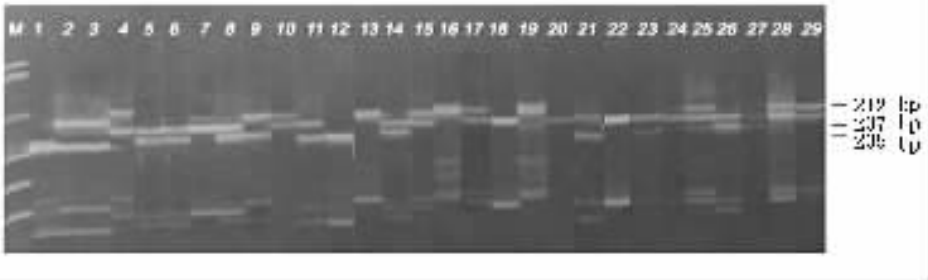


图 2 引物 CsCAT1 在茅栗居群中扩增出的多态谱带
Fig.2 Microsatellite polymorphism in the population of *Castanea squinii* with SsrCsCAT1

表 2 茅栗随机大居群及其 3 个亚居群取样及遗传多样性参数

居群 Population	平均等位 基因数 A	平均有效等位 基因数 A_e	预期杂合度 H_e	观察杂合度 H_o	特有等位 基因数 A_{pe}	近交系数 F_{IS}	取样个体数 Sampling size
随机大居群 Panmictic population	9.778(1.561 5)	4.954(0.595 8)	0.776(0.024 4)	0.625		0.190	197
广水 Guangshui	6.111(0.696 1)	3.578(0.332 9)	0.705(0.021 4)	0.634	3	0.109	43
麻城 Macheng	8.444(1.168 0)	4.537(0.556 7)	0.750(0.033 9)	0.620	20	0.169	118
岳西 Yuexi	6.000(0.500 0)	3.638(0.330 7)	0.704(0.030 2)	0.622	6	0.104	36

A: Mean number of alleles A_e : Mear effective number of alleles A_{pe} : Number of private alleles H_e 、 H_o 、 F_{IS} : 见表 1 See Table 1 括号内为标准误差 SE in parentheses

表 3 茅栗随机大居群 10 个距离等级下的 Moran's I 值及其显著性
Table 3 Spatial autocorrelation coefficients (Moran's I) for 10 distance classes in panmictic population of *Castanea squinii*

位点 Locus	10 个距离等级(km)的 Moran's I 值 Moran's I for 10 distance classes (km)										累积机率 Cum. Prob
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
CsCAT1-180	0.32**	0.26**	0.31**	0.16**	-0.03	-0.13**	-0.15**	-0.55**	-0.57**	0.15**	0.000*
CsCAT1-188	0.01	0.02	-0.02	-0.07	0.02	-0.02	-0.00	-0.00	-0.01	0.01	0.045*
CsCAT1-190	0.07**	-0.09**	0.04*	-0.06**	-0.04*	0.01	0.00	-0.02	0.03	-0.02	0.001*
CsCAT2-209	0.15**	0.05**	0.06**	-0.01	-0.23**	-0.13**	0.02	-0.01	0.17**	-0.11**	0.000*
CsCAT3-201	0.09**	-0.02	0.03	-0.04	-0.17**	0.04*	-0.00	0.01	0.05*	-0.04	0.000*
CsCAT3-207	0.04**	0.01	-0.01	0.01	0.07**	-0.00	0.05**	-0.04*	-0.08**	-0.13**	0.000*
CsCAT4-230	0.06**	0.04*	-0.02	0.02	-0.00	-0.03	-0.12**	-0.02	-0.03	0.04**	0.000*
CsCAT4-238	0.10**	0.05**	-0.07**	-0.03	0.02	0.04**	0.04*	-0.11**	-0.03	-0.08**	0.000*
CsCAT4-242	0.07**	0.08**	0.01	0.15**	0.00	-0.11**	-0.20**	-0.07**	-0.11**	0.11**	0.000*
CsCAT4-253	0.05**	-0.05*	-0.01	-0.05*	-0.01	0.01	0.01	-0.02	-0.00	-0.00	0.056
CsCAT5-227	0.04**	-0.03	0.02	-0.01	0.01	-0.03	-0.06**	-0.01	-0.04	0.04*	0.037*
CsCAT5-232	0.12**	0.07**	0.07**	0.04*	0.07**	-0.01	-0.05*	-0.20**	-0.13**	-0.11**	0.000*
CsCAT7-205	0.16**	0.08**	-0.08**	0.00	-0.06**	0.01	-0.08**	-0.18**	0.00	0.09**	0.000*
CsCAT7-209	0.05**	0.05*	-0.04*	-0.01	-0.08**	0.02	0.00	-0.08**	-0.01	0.05**	0.000*
CsCAT7-215	0.02	-0.03	-0.03	0.02	-0.02	0.02	-0.03	0.01	-0.01	0.00	1.000
CsCAT7-217	-0.00	-0.02	0.02	0.00	0.02	-0.00	0.03	-0.01	-0.03	-0.07*	0.176
CsCAT8-190	0.02	-0.02	0.01	-0.01	-0.03	-0.05	0.02	-0.01	-0.02	0.02	0.780
CsCAT8-201	0.02	0.04*	0.04*	0.02	-0.05	-0.03	0.05*	-0.05	-0.11**	-0.00	0.001*
CsCAT8-204	-0.04	0.03	-0.02	-0.01	0.01	-0.03	0.01	-0.01	0.00	-0.01	0.798
CsCAT8-207	0.04*	0.01	-0.00	0.05**	-0.04*	-0.02	0.04**	-0.07**	-0.09**	0.01	0.000*
CsCAT14-150	-0.02	0.00	-0.01	-0.03	0.03*	-0.03	0.02	-0.01	0.00	-0.00	0.400
CsCAT14-153	0.03*	0.01	-0.01	0.05**	0.03*	-0.04	-0.05*	-0.01	0.02	-0.10**	0.000*
CsCAT14-155	0.14**	-0.01	0.05**	0.19**	0.07**	-0.12**	-0.11**	-0.02	0.09**	-0.41**	0.000*
CsCAT14-157	0.10**	0.08**	0.14**	0.11**	-0.13**	-0.26**	-0.08**	-0.02	-0.02	0.02	0.000*
CsCAT15-133	0.19**	0.16**	-0.01	-0.04	-0.16**	-0.15**	-0.04	0.09**	0.01	-0.09**	0.000*
CsCAT15-134	0.16**	0.11**	0.09**	0.12**	0.04*	-0.00	-0.12**	-0.28**	-0.06**	-0.08**	0.000*
CsCAT15-135	0.02	0.02	0.05*	-0.00	-0.06**	-0.06**	-0.02	-0.02	-0.05*	0.06**	0.022*
平均 Average	0.08	0.03	0.02	0.02	-0.03	-0.04	-0.03	-0.06	-0.04	-0.03	-
最大值 Maximum	0.32	0.26	0.31	0.19	0.07	0.04	0.05	0.09	0.17	0.15	-
最小值 Minimum	-0.04	-0.09	-0.08	-0.07	-0.23	-0.26	-0.20	-0.55	-0.57	-0.41	-

*, **: 分别代表 0.05 和 0.01 的显著水平 (Moran 检测) Significant at the 0.05 or 0.01 level, respectively (Moran test) 10 个距离等级分别为 10 distances (km): 0.038、0.074、0.109、0.228、116.286、116.454、138.492、138.542、138.641、293.360

2.2.2 亚居群的空间遗传结构

在广水亚居群,共得 55 个微卫星多态性等位基因,从中选取了 29 个频率在 10%~90%之间的等位基因进行空间自相关分析。在统计的 261 个 Moran's I 值中,有 71 个(27.2%)达显著水平(期望值 $E(I) = -0.036$),在 29 个等位基因中累计达显著水平的有 13 个(45%),其中在第 1~3 距离等级内(27~61 m),统计的平均 Moran's I 值大于期望值 $E(I)$,说明在 61 m 范围内居群具有显著的空间结构。随距离增大,正值减少而负值增加,在第 5~9 距离等级内(104~288 m),显著负相关的位点占大多数,说明居群在 104 m 以外,个体不相似。图 4a 为基于 29 个等位基因 Moran's I 平均值的空间相关模式图,也反映了广水亚居群在不同距离等级下的渐变模式。

在麻城亚居群,共得 75 个微卫星多态等位基因,从中选取 33 个可分析的等位基因用作空间自相关分析。在统计的 297 个 Moran's I 值中,有 73 个(24.6%)达显著水平($E(I) = -0.031$),在 9 个距离等级中累计达显著水平的等位基因有 19 个(58%)。从基于所有等位基因的 Moran's I 平均值可以看出,在第 1~4 距离等级(27~62 m)居群呈现微弱的空间结构,说明在 62 m 范围内的个体间存在相似关系,而在此范围以外则基本上为随机分布(图 4b)。

岳西亚居群 30 个符合条件的等位基因在 10 个距离等级(32~393 m)统计的 300 个 Moran's I 值中,有 40 个(13.3%)达显著水平($E(I) = -0.034$),在 10 个距离等级中累计达显著水平的等位基因有 5 个(16.7%)。图 4c 为基于等位基因 Moran's I 平均值在不同距离等级下的空间相关模式图,表明居

群在第 1~2 距离等级 (32~61 m) 呈现极微弱的空间结构,而在此距离范围以外则为随机分布。

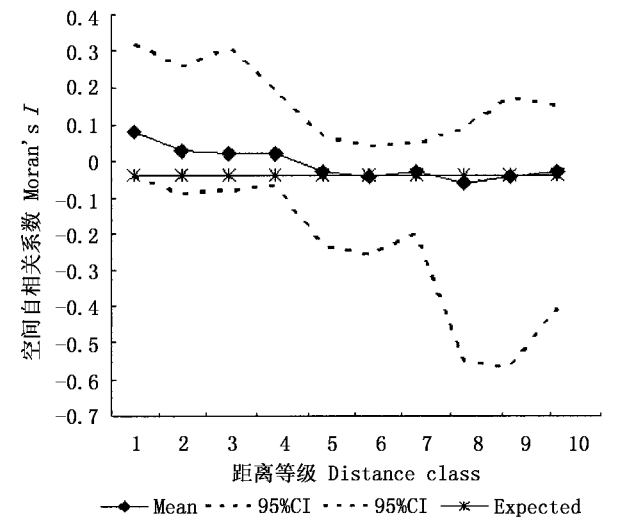


图3 依据 9 个微卫星位点随机大居群在 10 个距离等级上的 Moran's I 平均值得出的自相关图(95%CI: 95% 的置信间)
Fig.3 Correlogram using mean value of Moran's I at 9 Microsatellite loci and 10 distance intervals in panmictic population (95%CI: 95% confidence interval)

从 3 个亚居群的空间自相关分析可以看出,3 个亚居群在近距离范围内(61 或 62 m 内)都表现出一定程度的空间结构,其中广水亚居群的空间结构更为明显,而麻城亚居群和岳西亚居群虽然空间结构较微弱但是也达到显著的水平。在第一距离等级内,广水亚居群的 Moran's I 平均值($I = 0.14$)分别约为其它两个亚居群麻城($I = 0.04$)和岳西($I = 0.05$)的 3 倍,表明广水亚居群在近距离的空间结构比其它两个亚居群更强烈,3 个亚居群的空间相关模式图也反映了这一点(图 4a、b、c)。同时,在同一亚居群的各个等位基因及同一等位基因在不同亚居群也表现出不同的空间结构,例如:在广水亚居群中, CsCAT4-217、CsCAT4-232、CsCAT7-209 和 CsCAT15-133 等位基因表现出渐变模式,而其余等位基因则表现出斑块模式;CsCAT7-209 等位基因在广水亚居群中表现渐变模式,而在麻城和岳西两个亚居群中则为斑块模式(数据未列出)。

3 讨 论

3.1 茅栗居群的遗传多样性

本研究采用了壳斗科同属植物欧洲栗的微卫星引物,发现在 14 对引物中有 9 对可用于茅栗的遗传多样性研究,表明微卫星引物在欧洲栗和茅栗间具有较好的通用性,但是引物扩增片段的大小在物种

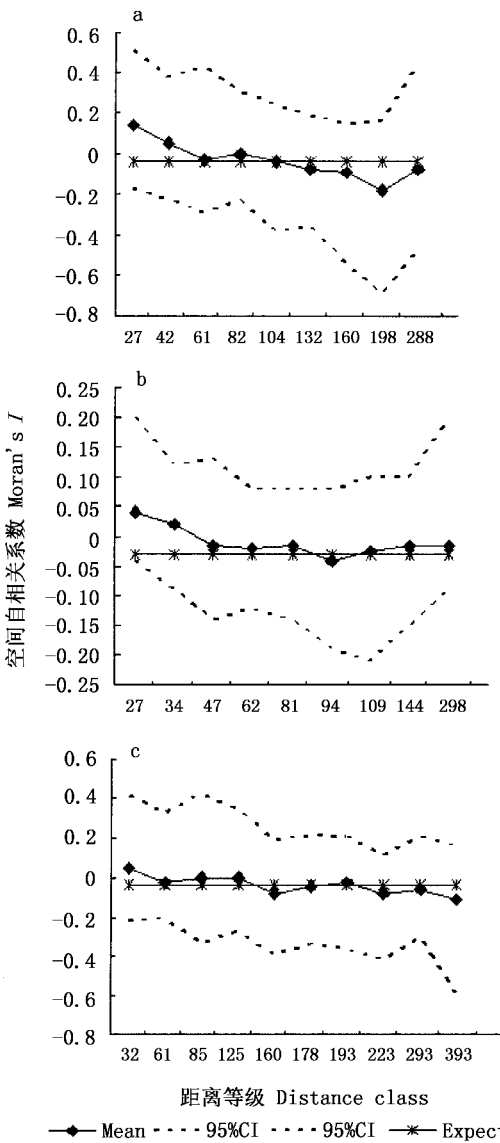


图4 依据 9 个微卫星位点 3 个亚居群的自相关图:广水(a)和麻城(b)亚居群在 9 个距离等级、岳西(c)亚居群在 10 个距离等级上的 Moran's I 平均值得出的自相关图(95%CI: 95% 的置信区间)
Fig.4 The correlogram of 3 subpopulations using mean value of Moran's I at 9 Microsatellite loci: 9 distance intervals in Guangshui(a) and Macheng(b) subpopulation, 10 distance intervals in Yuexi(c) subpopulation (95%CI: 95% confidence interval)

间稍有差异。研究的 9 对引物在茅栗中表现为丰富的多态性(表 2)。此微卫星引物在欧洲栗中亦表现出丰富的多态性: $A = 6.4$; $H_0 = 0.350 \sim 0.950$; $H_e = 0.649 \sim 0.835$ (Marinoni *et al.*, 2003)。

显然,茅栗自然居群具有非常丰富的居群遗传多样性($A = 9.78$; $H_0 = 0.355 \sim 0.817$; $H_e = 0.637 \sim 0.879$),这一结果明显高于等位酶水平的遗传多样性($A = 1.85$; $H_0 = 0.131 \sim 0.252$; $H_e = 0.130 \sim 0.188$)(郎萍和黄宏文,1999)。茅栗自然居群丰富的遗传多样性符合其生活史特征,茅栗为风媒异花

授粉的多年生木本植物,在我国广泛分布于 $102^{\circ} \sim 120^{\circ} \text{ E}$, $23^{\circ} \sim 34^{\circ} \text{ N}$ 之间。应用微卫星标记对其它壳斗科植物日本榉木(*Fagus crenata*)的研究也得出了相近的结果($A = 24.3$; $H_o = 0.668 \sim 0.877$; $H_e = 0.756 \sim 0.951$) (Asuka *et al.*, 2004)。Streiff 等(1998)利用微卫星标记与等位酶标记对两种壳斗科植物无梗花栎(*Q. petraea*)和夏栎(*Q. robur*)的研究结果进行比较,发现微卫星所得的平均每个位点的等位基因数、预期杂合度和观察杂合度($A = 8.5$, $H_e = 0.79 \sim 0.94$, $H_o = 0.70 \sim 0.80$)大大高于等位酶的结果($A = 1.5$, $H_e = 0.17 \sim 0.50$, $H_o = 0.14 \sim 0.37$),与本研究情况相似。

3.2 空间自相关分析

3.2.1 随机大居群的空间遗传结构

对大别山全境作为一个大居群进行空间自相关分析的结果显示,茅栗自然大居群缺乏空间结构,但是在近距离范围内(0.228 km),Moran's *I* 值为正值且显著,说明在 0.228 km 范围内存在空间遗传结构的正相关。而在此范围外,遗传结构呈随机分布。Hardy-Weinberg 平衡检测显示,所有的等位基因在各居群之间呈现均匀分布,近交系数 F_{IS} 也未偏离随机交配理论下的平衡;另外,居群每代交换的基因流 N_m 值(3.72)显示出居群间基因交流比较频繁,防止了居群之间的分化,从居群间的平均遗传分化度 $F_{ST} = 0.063$ 也可以看出,各亚居群之间分化程度不大,相似性很高,说明大别山全境茅栗为随机交配的大居群。然而大居群中近距离内显现的空间结构,说明与其中的 3 个亚居群又有密切关系,3 个亚居群之间相隔上百公里,由于取样是不连续的,平均每个亚居群的大小在 0.300 km 左右的范围内,而大居群在 0.228 km 范围内存在空间遗传结构的显著正相关性,此范围与每个亚居群的大小相似。可以推论,等位基因在每个亚居群大小的范围内呈聚集分布,而在各亚居群之间的长距离范围内呈随机分布,因此各亚居群之间没有空间结构,从而造成了大居群总体上缺乏空间结构,然而在近距离范围内又存在一定空间结构的复合模式。另外,茅栗是大别山广泛分布的一个物种,将大别山全境分布的茅栗视为一个随机大居群,所有茅栗个体在居群内呈随机分布,其遗传结构应呈现随机的空间分布。但是本研究只在大别山东、中、西 3 个部分进行了取样,因此,取样范围存在一定的局限性,如果大别山进行全境均等距离取样,如在南北两坡各采几个居群,则可能更全面了解植物区域性分布的居群遗传格局,

这有待将来进一步研究。茅栗自然居群的这种空间遗传结构基本上符合具有类似生活史特征植物理想大居群的特征,对于茅栗近缘种中国板栗大格局的空间遗传结构的分析也发现,中国板栗总体缺乏空间结构,而部分等位基因又表现出一定的空间结构(李作洲等,2002)。茅栗的风媒异花授粉繁育的特征使其在亚居群间形成长距离的基因流,而我国大陆的季风气候,特别是春夏之交的梅雨季节风向的反复变换促进了风媒植物不同地域亚居群间的花粉交流,从而大大削弱了地理隔离的遗传漂变作用。而此复合居群中各亚居群特殊的分布情况又使大居群在接近各亚居群大小的距离范围内存在一定的空间结构。

3.2.2 各亚居群的空间遗传结构

对各亚居群的空间遗传结构研究结果表明,3 个茅栗自然亚居群表现出不同的空间遗传结构特征,广水亚居群在 61 m 内具有显著的空间结构,而麻城亚居群和岳西亚居群在同一地理距离范围内只有微弱的空间结构。导致这种空间结构差异的原因可能是因为:1)生境的异质性,从群落的平面结构来看,广水亚居群为一条狭长的林带,且具有一定的坡度,而麻城亚居群和岳西亚居群的环境条件比较一致,都是在坡度较缓的丘陵地段。广水亚居群在地形、海拔、温度和湿度等环境因子上可能具有一定的异质性,因而对种子和花粉的散布的影响要大一些。在许多植物中已经发现种群内小尺度的分化与微生境的异质性有关(Liu & Godt, 1983),但是以上环境因子对空间结构的影响还有待于进一步更精确的调查研究。2)人类活动的影响,广水亚居群是一个原生的居群,远离当地居民,受到农业生产活动的影响较小,而麻城亚居群和岳西亚居群则位于耕作活动频繁的丘陵,因而受到人类活动的影响较大。据调查,大别山区是我国经济较落后的地区,由于资源开发不合理,植物资源破坏较严重,笔者野外也观察到,许多野生茅栗被砍伐以开垦农田种植经济作物,这使得茅栗个体数量减少,有效居群大小降低,种群密度变小,从而使空间遗传结构变弱(Ellstrand & Elam, 1993; Clegg & Brown, 1983; Schaal & Levin, 1976)。在美国五针松(*Pinus strobus*)的空间自相关分析中,同样发现因人类活动导致的居群空间遗传结构的这种差别(Marquardt & Epperson, 2004)。

茅栗各亚居群只是在近距离内(61 ~ 62 m)具有不同程度的空间遗传结构,即亚居群内遗传变异表现出一定的非随机空间分布。无性繁殖、微生境异

质性和距离隔离作用,即花粉和种子等繁殖体的有限散布是形成居群内空间结构的主要原因(Geburek, 1993; Streiff *et al.*, 1998; Chung & Epperson, 2000)。根据我们在野外的观察,茅栗的无性繁殖能力弱。在本研究中,龟山和岳西亚居群并不存在微生境异质性,所以导致其居群内空间结构的主要原因是有限的基因流,茅栗为风媒传粉,花粉可以远距离传播,因此导致茅栗亚居群这种空间结构的根本原因是种子在近距离的有限散播。茅栗种子主要靠重力和附着传播,种子易在母树附近形成家系结构,这一方面可能说明茅栗种子的有效散播距离约为 62 m,另一方面也可能是母系基因组对小格局的遗传结构具有重要影响。对于广水亚居群由于微生境异质性造成的差异选择进一步加剧了该居群的空间遗传结构。

尽管在近距离内表现出一定程度的空间遗传结构,但是随着空间距离的增加,居群的空间结构则不明显,或是空间上的斑块状分布。茅栗的这种空间遗传结构与其生活史特征和繁育系统是相吻合的。茅栗为雌雄同株异花、风媒异交物种,自花授粉基本不可能,而且又是大别山区常见的物种,使花粉得以远距离传播,从居群间微弱的遗传分化($F_{ST} = 0.063$)也可以说明这一点。因此,在茅栗居群中,由花粉介导的基因流可以抵消并防止因种子的有限散播而近距离形成家系结构,此外种子的再次散播和种子雨重叠也会消弱居群的空间结构(Chung *et al.*, 2002; Auska *et al.*, 2004)。本研究同时还表明,随着距离的增加,茅栗居群内的 Moran's I 变化很大,大部分等位基因呈斑块聚集状的空间分布模式,斑块内个体在遗传上呈现相似关系,而间距较大的个体间呈现不相似关系,事实上居群中等位基因聚集分布的现象在植物中是普遍存在的(Epperson & Allard, 1989)。总体来说,茅栗居群内的空间遗传结构与壳斗科的其它一些物种(无梗花栎和夏栎(Cottrell *et al.*, 2003); 日本榉木(Auska *et al.*, 2004); 欧洲水青冈(*F. sylvatica*)(Vornam *et al.*, 2004))基本上是一致的,但居群所处不同的生境会导致居群内空间遗传结构的差异。

本研究利用微卫星标记揭示了茅栗自然居群随机大居群和亚居群的空间遗传结构,以及两者之间的关系,发现随机大居群内基本上缺乏空间结构,而各亚居群内具有一定程度显著的空间结构。大居群虽然总体上缺乏空间结构,但是在接近各亚居群大小的范围内具有一定的空间结构,这是由各亚居群

内的空间遗传结构引起的。本文揭示出的遗传结构显然与种子散播、花粉流、生境异质性和人类活动对植物自然居群空间遗传结构的相对影响大小有关,但是我们还不能定量地估测这些因素在居群遗传结构形成中的作用大小及其后果。另外,由于 3 个亚居群沿大别山东、中、西部呈线形分布,因此我们的结构只能部分的说明这个随机大居群和各亚居群之间在空间遗传结构上的不同和联系。后续研究可以考虑核基因组-叶绿体 DNA 分子标记相结合的方法以及采用父本分析的方法测定花粉流和种子散布的相对作用则有助于进一步探讨这些问题,同时关于微生境选择的生态因数方面的研究,如大别山南北两坡居群差异,也将使我们对一个随机分布的复合居群和其中各亚居群之间在遗传结构的各种关系及其动态规律有更深入的理解。

参 考 文 献

- Asuka Y, Tomaru N, Nisimura N, Tsumura Y, Yamamoto S (2004). Heterogeneous genetic structure in a *Fagus crenata* population in an old-growth beech forest revealed by microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 13, 1241–1250.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Stuhl K (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Bjornstad ON, Falck W, Stenseth NC (1995). A geographic gradient in small rodent density fluctuations: a statistical modeling approach. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 262, 127–133.
- Chung MG (1996). Spatial genetic structure among Korean populations of *Hosta minor* and *H. capitata* (Liliaceae). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 37, 25–30.
- Chung MG, Epperson BK (2000). Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms in a population of *Eurya japonica* (Theaceae). *Silvae Genetica*, 49, 1–4.
- Chung MY, Nason J, Chung MG, Kim KJ, Park CW, Sun BY, Pak JH (2002). Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 89, 1229–1236.
- Clegg MT, Brown AHD (1983). The founding of plant populations. In: Schonewald-Cox CM, Chambers SM, MacBryde B, Thomas WL eds. *Genetics and Conservation*. Benjamin-Cummings, Menlo Park, CA, 216–228.
- Cottrell JC, Munro RC, Tabbener HE, Milner AD, Forrest GI, Lowe AJ (2003). Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history. *Forest Ecology and Management*, 176, 287–303.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review Ecology and Systematics*, 34, 217–242.
- Epperson BK, Allard RW (1989). Spatial structure of two-locus genotypes under isolation by distance. *Genetics*, 140, 365–

- 375.
- Epperson BK (1990). Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS eds. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer Associates, MA, 229 – 253.
- Epperson BK (1992). Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. *New Forests*, 6, 257 – 278.
- Epperson BK (1993). Recent advances in correlation studies of spatial patterns of genetic variation. *Evolutionary Biology*, 27, 95 – 155.
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME (2003). Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113, 351 – 365.
- Geburek T (1993). Are gene randomly distributed over space in mature populations of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.)? *Annals of Botany*, 71, 217 – 222.
- Huang HW (黄宏文) (1998). Review of current research of the world *Castanea* species and importance of germplasm conservation of China native *Castanea* species. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 16, 171 – 176. (in Chinese)
- Lang P (郎萍), Huang HW (黄宏文) (1999). Genetic diversity and geographic variation in natural populations of the endemic *Castanea* species in China. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 41, 651 – 657. (in Chinese with English abstract)
- Levin DA, Kerster HW (1974). Gene flow in seed plants. *Evolutionary Biology*, 7, 139 – 220.
- Li CC, Horvitz DG (1953). Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*, 5, 107 – 117.
- Li ZZ (李作洲), Lang P (郎萍), Huang HW (黄宏文) (2002). Spatial structure of allozyme frequencies in *Castanea mollissima* BL. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 20, 165 – 170. (in Chinese with English abstract).
- Liu EH, Godt MJW (1983). The differentiation of populations over short distance. In: Schonewald-Cox CM, Chambers MS, MacBryde B, Thomas W eds. *Genetics and Conservation*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, California, 78 – 95.
- Marinoni D, Akkak A, Bounous G, Edwards KJ, Botta R (2003). Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Molecular Breeding*, 11, 127 – 136.
- Marquardt PE, Epperson BK (2004). Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology*, 13, 3305 – 3315.
- McCauley DE, Stevens JE, Peroni PA, Raveill JA (1996). The spatial distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphisms within a population of *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*, 83, 727 – 731.
- Peakall R, Smouse PE (2001). *GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research*. Australian National University, Canberra, Australia.
- Pigliucci M, Villani F, Benedettelli S (1990). Geographic and climatic factors associated with the spatial structure of gene frequencies in *Castanea sativa* Mill. from Turkey. *Journal of Genetics*, 69, 141 – 149.
- Robert R, Sokal FMLS (1978). Spatial autocorrelation in biology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 10, 199 – 228.
- Rogers SO, Bendich AJ (1985). Extraction of DNA from milligram amount of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, 5, 69 – 76.
- Rutter PA, Miller G, Payne JA (1990). Chestnuts. In: Moore JN, Ballington JR Jr eds. *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*. The International Society for Horticultural Science, Wageningen, The Netherlands, 761 – 788.
- Sanguinetti CJ, Dias NE, Simpson AJC (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17, 915 – 919.
- Schaal BA, Levin DA (1976). The demographic genetics of *Liatris cylindracea* Michx. *The American Naturalist*, 110, 191 – 206.
- Slatkin M, Barton H (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43, 1349 – 1368.
- Sokal RR, Oden NL (1978a). Spatial autocorrelation in biology. 1. Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 10, 199 – 228.
- Sokal RR, Oden NL (1978b). Spatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 10, 229 – 249.
- Sokal RR, Jacquez GM, Wooten M (1989). Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. *Genetics*, 121, 845 – 855.
- Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkellner H, Glossl H, Kremer A (1998). Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. & *Quercus petraea* (Matt.) Leibl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology*, 7, 317 – 328.
- Vekemans X, Hardy OJ (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13, 921 – 935.
- Vornam B, Decarli N, Gailing O (2004). Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L.) based on microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 5, 561 – 570.
- Watenberg D (1989). SAAP 4.3.—A *Spatial Autocorrelation Analysis Program*. Exeter Software, Setauket, NY, USA.
- Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358 – 1370.
- Williams CG, Hamrick JL (1996). Elite populations for conifer breeding and gene conservation. *Canadian Journal of Forest Research*, 26, 453 – 461.
- Workman PL, Niswander JD (1970). Population studies on south-western Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics*, 22, 24 – 49.