

# 安徽羽叶报春同型花和二型花居群的遗传多样性和遗传结构分析

李永权<sup>1</sup>, 章伟<sup>1</sup>, 徐延年<sup>2</sup>, 吕国胜<sup>1</sup>, 邵剑文<sup>1,2,①</sup>

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 安徽省重要生物资源保护与利用研究重点实验室, 安徽 芜湖 241000)

**摘要:** 以安徽省秋浦河流域安徽羽叶报春(*Primula merrilliana* Schltr.)的2个同型花居群[包括铜陵市义安区凤凰山(FHS)和池州市贵池区阴山(YS)居群]和4个二型花居群[包括池州市石台县大王洞(DWD)、池州市贵池区谷村(GC)、池州市石台县立新村(LXC)和池州市石台县莲花田(LHT)居群]为研究对象,采用10对SSR引物对上述6个居群嫩叶的总DNA进行了PCR扩增,在此基础上对各居群遗传多样性和遗传结构进行了分析。结果表明:6个居群的等位基因数、有效等位基因数、稀有等位基因数、观测杂合度和期望杂合度的平均值较低,分别为4.8、2.8、2.7、0.29和0.43,并且,LHT和LXC居群的上述指标较高,而FHS和YS居群的上述指标较低;同型花居群的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度和期望杂合度均低于二型花居群,平均值分别为3.0、2.1、0.12和0.35,且无稀有等位基因。居群间的遗传分化系数和遗传距离均较小,平均值分别为0.34和0.56,且这2个指标与居群间的地理距离无明显相关性。由LHT和LXC居群向其他居群的基因流较大(0.057~0.065),而由FHS和YS居群向其他居群的基因流较小(0.044~0.046);并且,在同型花和二型花居群间存在明显的基因流屏障。分子方差分析(AMOVA)结果表明:同型花和二型花居群间的遗传差异不明显,且64.76%的遗传变异存在于居群内。聚类分析和主坐标分析(PCoA)结果均表明同型花和二型花居群间未明显分组。研究结果显示:安徽羽叶报春居群的遗传多样性较低;同型花居群的遗传多样性低于二型花居群,但二者的遗传分化并不明显。建议加强对秋浦河流域上游安徽羽叶报春居群及其生境的保护,并将同型花居群视为不同于二型花居群的独立单元进行遗传保护。

**关键词:** 安徽羽叶报春; 同型花居群; 二型花居群; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: Q949.7 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)02-0001-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.02.01

**Analyses on genetic diversity and genetic structure of homostyled and distyled populations of *Primula merrilliana*** LI Yongquan<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, XU Yannian<sup>2</sup>, LYU Guosheng<sup>1</sup>, SHAO Jianwen<sup>1,2,①</sup> (1. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China; 2. Provincial Key Laboratory for Conservation and Utilization of Important Biological Resource in Anhui, Wuhu 241000, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(2): 1-8

**Abstract:** Taking two homostyled populations [including populations from Fenghuangshan in Yian District of Tongling City (FHS) and Yinshan in Guichi District of Chizhou City (YS)] and four distyled populations [including populations from Dawangdong in Shitai County of Chizhou City (DWD), Gucun in Guichi District of Chizhou City (GC), Lixincun in Shitai County of Chizhou City (LXC), and Lianhuatian in Shitai County of Chizhou City (LHT)] of *Primula merrilliana* Schltr. in Qiupu River basin of Anhui Province as research objects, PCR amplifications of total DNA from tender leaves of above six populations were conducted by using ten pairs of SSR primers. On the basis, genetic diversity and genetic structure of each population were analyzed. The results show that averages of allele number, effective allele number, rare allele number, observed heterozygosity, and expected heterozygosity of six

收稿日期: 2017-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31570336); 生物环境与生态安全安徽省高校重点实验室项目

作者简介: 李永权(1993—),男,安徽宿州人,硕士研究生,主要从事植物资源保护与利用方面的研究工作。

①通信作者 E-mail: shaojw@ahnu.edu.cn

populations are relatively low with values of 4.8, 2.8, 2.7, 0.29, and 0.43, respectively, and above indexes of LHT and LXC populations are relatively high, while those of FHS and YS populations are relatively low; allele number, effective allele number, observed heterozygosity, and expected heterozygosity of homostyled populations are all lower than those of distyled populations with averages of 3.0, 2.1, 0.12, and 0.35, respectively, and without rare allele. Genetic differentiation coefficient and genetic distance among populations are both relatively small with averages of 0.34 and 0.56, respectively, and these two indexes have no obvious correlation with geographic distance among populations. Gene flows from LHT and LXC populations to other populations are relatively large (0.057–0.065), while those from FHS and YS populations to other populations are relatively small (0.044–0.046). Moreover, there are obvious gene flow barriers between homostyled and distyled populations. The result of analysis of molecular variance (AMOVA) shows that the genetic difference between homostyled and distyled populations is not obvious, and 64.76% of the genetic variation is existed within population. The cluster analysis and principal coordinate analysis (PCoA) results both show that there is no obvious group between homostyled and distyled populations. It is suggested that the genetic diversity of *P. merrilliana* populations is relatively low; that of homostyled populations is lower than that of distyled populations, but the genetic differentiation between them is not obvious. It is recommended to strengthen the protection of *P. merrilliana* populations and their habitats in upper reaches of Qiupu River basin, and homostyled populations should be considered as independent units differing from distyled populations for genetic protection.

**Key words:** *Primula merrilliana* Schltr.; homostyled population; distyled population; genetic diversity; genetic structure

二型花柱 (distyly) 是一种最常见的雌雄蕊异位类型,其产生和维持机制一直是进化生物学和生态学的研究热点,迄今为止,至少发现有 23 科植物存在二型花柱<sup>[1]</sup>。二型花不但具有明显的雌雄蕊交互式异位特征(即长柱花柱头位于花筒口且花粉囊位于花筒中部,短柱花柱头位于花筒中部且花粉囊位于花筒口),而且还具有严格的自交不亲和特性,导致二型花植物只能通过不同花间的受粉来完成正常结籽过程<sup>[2-4]</sup>。但是,偶尔发生的等位基因重组互换等现象可导致植物的二型花同型化,形成柱头和花粉囊等高的长柱同型花或短柱同型花,自交不亲和性随之丧失,这些二型花植物在开花后可自花受粉并结籽<sup>[5]</sup>。通常情况下,在二型花转变为同型花后,植物的繁育系统也由异交变为自交,这一转变可能会降低植物有效种群规模,增加连锁不平衡和基因清除效应,进而降低植物居群的遗传多样性,促进居群间的遗传分化<sup>[6]</sup>,甚至可能产生新物种<sup>[7-8]</sup>。

全世界的报春花属 (*Primula* Linn.) 植物约有 500 种<sup>[9-10]</sup>,其中,近 90% 的种类具有二型花柱,剩余约 10% 的种类具有同型花柱。报春花属植物是最早开展二型花柱适应性进化研究的植物材料<sup>[3]</sup>,目前该属已成为二型花柱进化生物学的模式材料。安徽羽叶报春 (*Primula merrilliana* Schltr.) 具有典型的二型花柱,花期较长,园艺开发和应用价值很

高<sup>[11-12]</sup>。然而,该种仅分布于安徽南部海拔 50 ~ 1 000 m 的丘陵山区,喜生于山体北坡比较阴湿的林下、溪边和路旁的岩壁上<sup>[13]</sup>。近几十年来,由于人类活动对生境的破坏作用,安徽羽叶报春的野生种群数量明显下降,因此,陈明林等<sup>[14]</sup>建议将其列为安徽省重点保护野生植物。

相关研究结果显示:安徽羽叶报春二型花居群的遗传多样性较高,且在不同生境中分化明显<sup>[15-16]</sup>。作者在 2014 年至 2015 年的野外调查中发现,安徽省铜陵市凤凰山和池州市阴山存在安徽羽叶报春的长柱同型花居群,并且,与相近区域的二型花居群个体相比,除花朵同型、花冠直径较小外,这些长柱同型花居群个体的其他形态性状几乎没有区别。然而,这些同型花居群与二型花居群的遗传分化和遗传多样性差异及基因流情况等均未明确。为了弄清这些问题,作者选用扩增结果稳定且扩增条带多态性较高的 10 对 SSR 引物,对分布于安徽省秋浦河流域铜陵市凤凰山和池州市阴山的安徽羽叶报春 2 个长柱同型花居群及其附近区域的 4 个二型花居群的总 DNA 进行了 PCR 扩增,在此基础上对 6 个居群的遗传多样性和遗传结构进行了分析,以期明确安徽羽叶报春二型花转变为同型花后遗传多样性和遗传结构的变化规律,为探究植物二型花柱的维持机制提供参考资料,并为安徽羽叶报春保护策略制订提供指导依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

于 2016 年 3 月至 4 月,对安徽省秋浦河流域的 6 个安徽羽叶报春居群进行采样,各居群的基本情况见表 1。其中,铜陵市义安区凤凰山(FHS)和池州市贵池区阴山(YS)居群为同型花居群(均为长柱同型花,柱头与花粉囊等高且均位于花筒口),分别位于秋浦河

流域下游的低矮丘陵山区;池州市石台县大王洞(DWD)、池州市贵池区谷村(GC)、池州市石台县立新村(LXC)和池州市石台县莲花田(LHT)居群为二型花居群(长柱花和短柱花比例约 1:1),其中,DWD 和 GC 居群位于秋浦河流域中游的低山或丘陵区,LXC 和 LHT 居群位于秋浦河流域上游的低山或丘陵区。每个居群随机选取约 20 株相对分散的植株,每株采集 2 或 3 枚长势相似的嫩叶,放入透气的茶叶包内,用硅胶密封干燥,于室温条件下保存、备用。

表 1 安徽羽叶报春供试居群的基本情况

Table 1 Basic status of populations of *Primula merrilliana* Schltr. tested

居群 <sup>1)</sup> Population <sup>1)</sup>	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔/m Altitude	花朵类型 Flower type	株数 <sup>2)</sup> Individual number <sup>2)</sup>	样本数 Sample number
FHS	N30°51'21"	E118°01'28"	80-130	同型花 Homostyle	约 1 000 About 1 000	19
YS	N30°26'31"	E117°35'40"	100-150	同型花 Homostyle	约 800 About 800	19
DWD	N30°21'07"	E117°20'49"	100-350	二型花 Distyle	约 1 000 About 1 000	20
GC	N30°23'41"	E117°30'15"	30-200	二型花 Distyle	约 600 About 600	20
LXC	N30°15'29"	E117°34'05"	100-500	二型花 Distyle	大于 3 000 More than 3 000	19
LHT	N30°09'03"	E117°35'04"	50-300	二型花 Distyle	约 1 000 About 1 000	20

<sup>1)</sup> FHS: 铜陵市义安区凤凰山 Fenghuangshan in Yian District of Tongling City; YS: 池州市贵池区阴山 Yinshan in Guichi District of Chizhou City; DWD: 池州市石台县大王洞 Dawangdong in Shitai County of Chizhou City; GC: 池州市贵池区谷村 Gucun in Guichi District of Chizhou City; LXC: 池州市石台县立新村 Lixineun in Shitai County of Chizhou City; LHT: 池州市石台县莲花田 Lianhuanian in Shitai County of Chizhou City.

<sup>2)</sup> 居群内安徽羽叶报春株数 Individual number of *Primula merrilliana* Schltr. in population.

### 1.2 方法

采用改良的 CTAB 法<sup>[17]</sup>提取各居群嫩叶的总 DNA。选用本实验室开发的扩增结果稳定且扩增条带多态性较高的 10 对 SSR 引物,各引物的序列及退火温度见表 2。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司,并对上游引物的 5'端进行荧光修饰(FAM、HEX 或 TAMRA)<sup>[15]</sup>。

扩增反应体系总体积为 15.0  $\mu\text{L}$ ,包括 DreamTaq

Green PCR Master Mix (2 $\times$ ) 7.5  $\mu\text{L}$ 、100 ng  $\cdot$   $\mu\text{L}^{-1}$  总 DNA 0.4  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  正向引物和反向引物各 0.3  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 6.5  $\mu\text{L}$ 。使用 Bio-Rad iCycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)进行扩增反应,扩增程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s、引物相应退火温度退火 60 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

扩增产物在质量体积分数 2.0% 琼脂糖凝胶上进

表 2 用于安徽羽叶报春 6 个居群 PCR 扩增的引物序列及退火温度

Table 2 Sequences and annealing temperatures of primers used for PCR amplification of six populations of *Primula merrilliana* Schltr.

引物编号 No. of primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')		退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	
Pm2	CGCCTACAGTGTGGGA	CTATCTCACCTGCGTCT	52
Pm6	TACATCCAATAAACTGA	TGTGGTGGCCTTCTAACT	52
Pm7	TTGTTACCCGACGCATAC	TTACACGCACCAAATCAT	48
Pm8	CATCACCCATTGTTCTTA	CTACTACATTGTTATTTTAC	53
Pm9	AGACTCACGAGGAATACG	AGAAAAGGAGGAGACAAA	52
Pm10	AACTCCACATAACATCTT	AATTCTAAACTTAAGGGT	50
Pm12	TAAAACCTCCTGGAGGGTAC	ATCGCCCAATGGAGTGAA	56
Pm13	GAGGACAGGCACACAGA	TCCCCAACTTCATGCTCTT	55
Pm16	AACCACTCGTCGTCCTAA	CGATAGATTGCCTTACCC	56
Pm17	TAAATCAAGGTAGCAACT	TACCTACCATTACTCCC	49

行电泳检测;按照不同荧光混合后交由上海点晶生物科技有限公司采用 ABI 3700 基因测序仪(美国 ABI 公司)进行毛细管电泳测序分析,使用 GeneMarker 1.91 软件对测序结果进行判读,获得微卫星基因型数据。

### 1.3 数据分析

使用 Genepop 4.0 软件检验位点间是否存在连锁不平衡及各居群是否偏离哈温平衡;使用 FSTAT 2.9.3 软件计算各居群的等位基因数、遗传分化系数和近交系数;使用 Popgene 3.2 软件计算各居群的观测杂合度和期望杂合度;使用 GenAlEx 6 软件计算各居群的有效等位基因数和稀有等位基因数。

使用 TFGA 软件对居群间的遗传分化系数和遗传距离与地理距离的相关性进行 Mantel 检验;使用 BayesAss 1.3 软件计算居群间的基因流;使用 Barrier 2.2 软件分析居群间可能存在的主要基因流屏障;使用 Arlequin 3.5 软件对同型花和二型花居群间、所有居群间及各居群内的遗传变异进行分子方差分析(AMOVA);使用 Structure 2.2 软件对所有居群及样株进行聚类分析, $K$  值设为 6,重复分析 8 次;burn-in 设为 100 000,run-length 设为 1 000 000,使用混合模型(admixture model)<sup>[18]</sup> 计算  $\Delta K$  值。使用 GenAlEx 6 软件进行主坐标分析(PCoA)并制图。

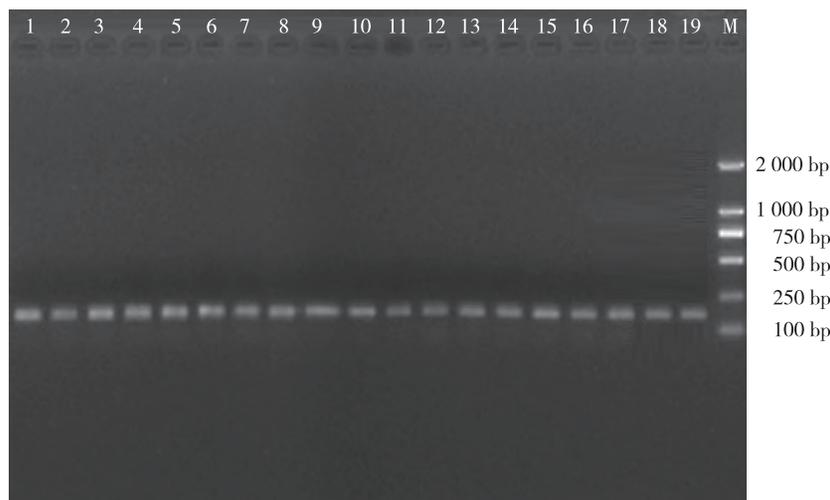
使用 SPSS 19.0 统计分析软件对相关数据进行统计和分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 安徽羽叶报春居群的遗传多样性分析

采用供试 10 对 SSR 引物对安徽羽叶报春 6 个居群叶片的总 DNA 进行 PCR 扩增,其中,引物 Pm10 对铜陵市义安区凤凰山(FHS)居群 19 个单株的扩增结果见图 1。10 对 SSR 引物在 6 个居群的 117 个单株中共扩增出 129 个等位基因,平均每对引物扩增出约 13 个等位基因。Genepop 软件检测结果表明:仅少量位点在个别居群中存在连锁现象,未发现有位点在 3 个以上居群中与其他位点连锁。

对安徽羽叶报春各居群的遗传多样性分析结果(表 3)表明:安徽羽叶报春 6 个居群的等位基因数、有效等位基因数和稀有等位基因数的平均值分别为 4.8、2.8 和 2.7,观测杂合度、期望杂合度和近交系数的平均值分别为 0.29、0.43 和 0.38。其中,FHS 居群的等位基因数、有效等位基因数、稀有等位基因数、观测杂合度和期望杂合度均最低,分别为 2.5、1.8、0.0、0.05 和 0.31,说明该居群的遗传多样性最低;池州市石台县立新村(LXC)和池州市石台县莲花田(LHT)居群的上述指标均较高,2 个居群的等位基因数分别为 6.4 和 7.5,有效等位基因数分别为 3.2 和 4.7,稀有等位基因数分别为 4.0 和 8.0,观测杂合度分别为 0.48 和 0.37,期望杂合度分别为 0.53 和 0.56,



1-19: 单株编号 No. of individual; M: DNA marker.

图 1 引物 Pm10 对安徽羽叶报春铜陵市义安区凤凰山居群 19 个单株的扩增结果  
Fig. 1 Amplification result of nineteen individuals in population of *Primula merrilliana* Schltr. from Fenghuangshan in Yian District of Tongling City by primer Pm10

表 3 安徽羽叶报春 6 个居群的遗传多样性 ( $\bar{X} \pm SD$ )  
Table 3 Genetic diversity of six populations of *Primula merrilliana* Schltr. ( $\bar{X} \pm SD$ )

居群 <sup>1)</sup> Population <sup>1)</sup>	等位基因数 Allele number	有效等位基因数 Effective allele number	稀有等位基因数 Rare allele number	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	近交系数 Inbreeding coefficient
FHS	2.5±0.4	1.8±0.3	0.0±0.0	0.05±0.03	0.31±0.09	0.81±0.15
YS	3.4±1.0	2.4±0.7	0.0±0.0	0.20±0.09	0.38±0.10	0.51±0.13
DWD	4.9±1.0	2.5±0.4	3.0±0.0	0.41±0.10	0.46±0.09	0.15±0.12
GC	4.1±1.1	2.2±0.7	1.0±0.0	0.23±0.10	0.32±0.10	0.32±0.13
LXC	6.4±1.0	3.2±0.7	4.0±0.0	0.48±0.11	0.53±0.09	0.11±0.10
LHT	7.5±0.8	4.7±1.1	8.0±0.0	0.37±0.09	0.56±0.12	0.36±0.07
平均值 Average	4.8±1.9	2.8±1.0	2.7±3.1	0.29±0.16	0.43±0.11	0.38±0.26
HP	3.0±0.6	2.1±0.4	0.0±0.0	0.12±0.10	0.35±0.05	0.66±0.21
DP	5.7±1.5	3.1±1.1	4.0±2.9	0.37±0.11	0.47±0.10	0.23±0.12

<sup>1)</sup> FHS: 铜陵市义安区凤凰山 Fenghuangshan in Yian District of Tongling City; YS: 池州市贵池区阴山 Yinshan in Guichi District of Chizhou City; DWD: 池州市石台县大王洞 Dawangdong in Shitai County of Chizhou City; GC: 池州市贵池区谷村 Gucun in Guichi District of Chizhou City; LXC: 池州市石台县立新村 Lixincun in Shitai County of Chizhou City; LHT: 池州市石台县莲花田 Lianhuatian in Shitai County of Chizhou City. HP: 同型花居群 Homostyled population; DP: 二型花居群 Distyled population.

说明这 2 个居群的遗传多样性相对较高。值得注意的是, FHS 居群的近交系数最高(0.81), 池州市贵池区阴山(YS)居群的近交系数也较高(0.51), 而 LXC 和 LHT 居群的近交系数相对较低(分别为 0.11 和 0.36)。

对安徽羽叶报春同型花和二型花居群的遗传多样性分析结果(表 3)表明: 同型花居群的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度和期望杂合度(分别为 3.0、2.1、0.12 和 0.35)均低于二型花居群(分别为 5.7、3.1、0.37 和 0.47), 说明安徽羽叶报春同型花居群的遗传多样性低于二型花居群。然而, 同型花居群(0.66)的近交系数却明显高于二型花居群(0.23)。值得注意的是, 所有稀有等位基因均出现在二型花居群中, 而在同型花居群中未检测到稀有等位基因。

## 2.2 安徽羽叶报春居群的遗传结构分析

安徽羽叶报春 6 个居群间的遗传分化系数和遗传距离见表 4。由表 4 可以看出: 安徽羽叶报春 6 个居群间遗传分化系数的平均值为 0.34, 其中, 铜陵市义安区凤凰山(FHS)和池州市贵池区阴山(YS)居群间的遗传分化系数最大(0.45), 池州市石台县大王洞(DWD)和池州市石台县立新村(LXC)居群间的遗传分化系数最小(0.22)。

由表 4 还可以看出: 安徽羽叶报春 6 个居群间遗传距离的平均值为 0.56, 其中, FHS 和 YS 居群间的遗传距离最大(0.74), FHS 和 LXC 居群间的遗传距离最小(0.37)。

Mantel 检验结果表明: 安徽羽叶报春各居群间的遗传分化系数和遗传距离与地理距离的相关系数分别为 0.356( $P=0.193$ )和 0.250( $P=0.370$ ), 说明安徽羽叶报春各居群间的遗传分化系数和遗传距离与地理距离无相关性。

安徽羽叶报春 6 个居群间的基因流计算结果(表 5)表明: 由 LXC 和池州市石台县莲花田(LHT)居群向其他居群的基因流较大, 为 0.057~0.065; 由 DWD 和池州市贵池区谷村(GC)居群向其他居群的基因流为 0.050~0.053; 由 FHS 和 YS 居群向其他居群的基因流较小, 为 0.044~0.046。上述结果说明越靠近秋

表 4 安徽羽叶报春 6 个居群间的遗传分化系数和遗传距离<sup>1)</sup>  
Table 4 Genetic differentiation coefficient and genetic distance among six populations of *Primula merrilliana* Schltr.<sup>1)</sup>

居群 Population	遗传分化系数或遗传距离 <sup>2)</sup> Genetic differentiation coefficient or genetic distance <sup>2)</sup>					
	FHS	YS	DWD	GC	LXC	LHT
FHS	—	0.45	0.43	0.38	0.28	0.35
YS	0.74	—	0.36	0.41	0.34	0.34
DWD	0.70	0.61	—	0.32	0.22	0.29
GC	0.42	0.53	0.39	—	0.29	0.38
LXC	0.37	0.65	0.38	0.38	—	0.24
LHT	0.67	0.71	0.63	0.73	0.54	—

<sup>1)</sup> FHS: 铜陵市义安区凤凰山 Fenghuangshan in Yian District of Tongling City; YS: 池州市贵池区阴山 Yinshan in Guichi District of Chizhou City; DWD: 池州市石台县大王洞 Dawangdong in Shitai County of Chizhou City; GC: 池州市贵池区谷村 Gucun in Guichi District of Chizhou City; LXC: 池州市石台县立新村 Lixincun in Shitai County of Chizhou City; LHT: 池州市石台县莲花田 Lianhuatian in Shitai County of Chizhou City.

<sup>2)</sup> “—”上方和下方数据分别为遗传分化系数和遗传距离 Data above and below “—” are genetic differentiation coefficient and genetic distance, respectively.

表 5 安徽羽叶报春 6 个居群间的基因流<sup>1)</sup>Table 5 Gene flow among six populations of *Primula merrilliana* Schltr.<sup>1)</sup>

居群 <sup>2)</sup> Population <sup>2)</sup>	基因流 Gene flow					
	FHS	YS	DWD	GC	LXC	LHT
FHS	—	0.044	0.044	0.044	0.045	0.046
YS	0.045	—	0.044	0.044	0.045	0.046
DWD	0.052	0.052	—	0.053	0.053	0.052
GC	0.050	0.051	0.051	—	0.051	0.050
LXC	0.058	0.058	0.058	0.058	—	0.057
LHT	0.063	0.064	0.064	0.063	0.065	—

<sup>1)</sup> FHS: 铜陵市义安区凤凰山 Fenghuangshan in Yian District of Tongling City; YS: 池州市贵池区阴山 Yinshan in Guichi District of Chizhou City; DWD: 池州市石台县大王洞 Dawangdong in Shitai County of Chizhou City; GC: 池州市贵池区谷村 Gucun in Guichi District of Chizhou City; LXC: 池州市石台县立新村 Lixincun in Shitai County of Chizhou City; LHT: 池州市石台县莲花田 Lianhuatian in Shitai County of Chizhou City.

<sup>2)</sup> 表中数据为由此列中居群向其他居群的基因流 Data in the table are gene flows from populations in this column to other populations.

浦河流域上游的安徽羽叶报春居群,其基因更容易向其他居群流动。进一步分析结果表明:第 1 基因流屏障介于 FHS 和其他居群间,第 2 基因流屏障介于二型花和同型花居群间。

分子方差分析(AMOVA)结果(表 6)表明:同型花和二型花居群间的遗传差异不显著( $P>0.05$ );各居群间出现一定的遗传分化,居群间遗传变异占总遗传变异的 36.40% ( $P<0.001$ );64.76% 的遗传变异存在于居群内,说明安徽羽叶报春居群的主要遗传变异存在于居群内。

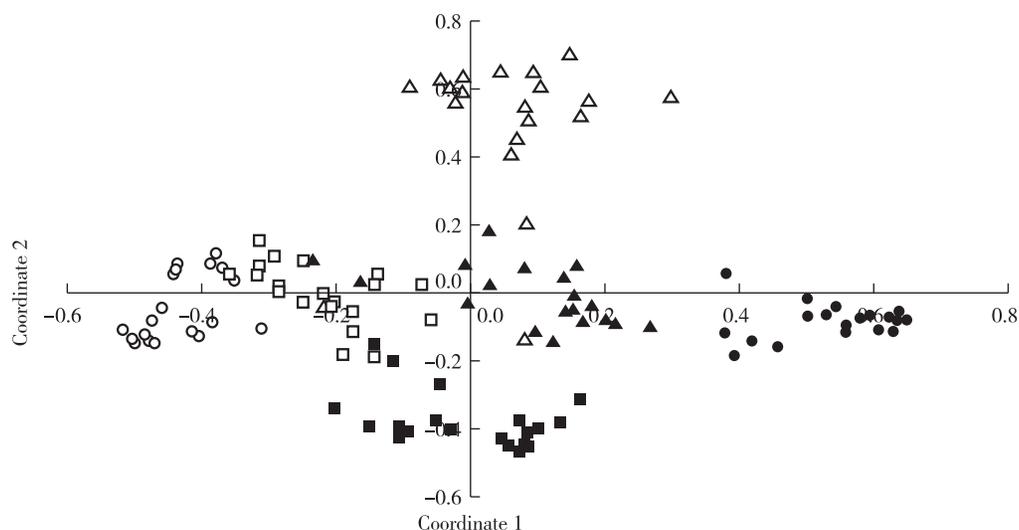
聚类分析结果表明: $\ln P(D)$  值随着  $K$  值的升高而持续且均匀的上升,且  $\Delta K$  值无明显峰值(最大值仅为 6.75),表明安徽羽叶报春各居群间的聚类结果并不明显。

主坐标分析(PCoA)结果(图 2)表明:2 个同型花

表 6 安徽羽叶报春 6 个居群的分子方差分析(AMOVA)

Table 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) among six populations of *Primula merrilliana* Schltr.

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of square	方差 Variance	方差比例/% Percentage of variance	$P$ 值 $P$ value
同型花和二型花居群间 Between homostyled and distyled populations	1	39.21	-0.03	-1.16	>0.05
居群间 Among populations	4	173.43	1.06	36.40	<0.001
居群内 Within population	228	430.02	1.89	64.76	<0.001
合计 Total	233	642.66	2.92	100.00	



●: 铜陵市义安区凤凰山 Fenghuangshan in Yian District of Tongling City; ○: 池州市贵池区阴山 Yinshan in Guichi District of Chizhou City; ■: 池州市贵池区谷村 Gucun in Guichi District of Chizhou City; □: 池州市石台县大王洞 Dawangdong in Shitai County of Chizhou City; ▲: 池州市石台县立新村 Lixincun in Shitai County of Chizhou City; △: 池州市石台县莲花田 Lianhuatian in Shitai County of Chizhou City.

图 2 安徽羽叶报春 6 个居群的主坐标分析(PCoA)

Fig. 2 Principal coordinate analysis (PCoA) on six populations of *Primula merrilliana* Schltr.

居群的供试植株总体上均位于 4 个二型花居群供试植株的外围,并且不同居群间的供试植株均存在一定程度的分离,但是同型花和二型花居群间的分离程度并未明显大于二型花居群间的分离程度,说明安徽羽叶报春的同型花和二型花植株间并没有产生明显的遗传分化。

### 3 讨 论

安徽羽叶报春为中国特有的野生珍稀花卉种类,具有较高的园艺开发和应用价值<sup>[19]</sup>,现仅分布于安徽省南部的丘陵山区。本研究涉及的 6 个自然居群均位于安徽羽叶报春分布区的西北角,即牯牛降北坡及九华山西北坡的秋浦河流域。研究结果显示:安徽羽叶报春 6 个居群的等位基因数、有效等位基因数、稀有等位基因数、观测杂合度和期望杂合度的平均值均较低,分别为 4.8、2.8、2.7、0.29 和 0.43,说明供试安徽羽叶报春各居群的遗传多样性较低;并且,4 个二型花居群的等位基因数、观测杂合度和期望杂合度的平均值分别为 5.7、0.37 和 0.47,明显低于安徽羽叶报春分布区中心的黄山及其周边区域的居群(等位基因数、观测杂合度和期望杂合度的平均值分别为 8.1、0.46 和 0.59)<sup>[15]</sup>,据此判断供试安徽羽叶报春居群遗传多样性的分布基本符合“核心-边缘”假说<sup>[20]</sup>。与中心分布区居群相比,由于安徽羽叶报春边缘分布区居群对生境的适应性较差,居群规模受气候因子变化的影响较大,更易受到瓶颈效应的影响。另外,由于安徽羽叶报春边缘分布区居群通常缺少传粉昆虫,其自交繁育系统更易被保留,居群的近交系数明显升高。综上所述,多因子综合作用促使安徽羽叶报春边缘分布区居群的遗传多样性明显下降。

本研究中,铜陵市义安区凤凰山(FHS)和池州市贵池区阴山(YS)居群为同型花居群,位于安徽羽叶报春分布区的最北缘,其等位基因数、观测杂合度和期望杂合度的平均值分别为 3.0、0.12 和 0.35,明显高于安徽羽叶报春的近缘种堇叶报春(*Primula cicutariifolia* Pax)(等位基因数、观测杂合度和期望杂合度的平均值分别为 1.4、0.01 和 0.07)<sup>[21]</sup>,但却低于供试二型花居群。Mast 等<sup>[8]</sup>认为,报春花属中约 10%的同型花种类由二型花种类进化而来,花型进化趋势为由二型花向同型花转变,据此推断 FHS 和 YS 居群也是由二型花植株演化而来,可能是由于基因重

组等原因在二型花居群中出现了少量的同型花植株,这些同型花植株的雌雄蕊等高且自交亲和性强,无需传粉昆虫便可采用自交方式完成有性生殖过程,并且,这些同型花植株具有较好的生殖保障和自动选择优势<sup>[22]</sup>,在分布区边缘居群中具有较高的适合度,从而被保留,最终形成同型花居群。植物的繁育系统是影响其居群遗传多样性的重要因子,在由异交向自交的转变过程中常常伴随着有效种群减小、连锁不平衡加剧及基因清除效应增强等现象,进而导致居群的遗传多样性降低甚至消失<sup>[23]</sup>。相关研究结果表明:具有自交繁育系统的植物种类的遗传多样性明显低于具有异交繁育系统的近缘种<sup>[24-25]</sup>,即使是同种类的不同居群,也会由于繁育系统的自交化转变而导致其遗传多样性明显下降<sup>[23,26-27]</sup>,这可能是导致安徽羽叶报春 FHS 和 YS 2 个同型花居群遗传多样性低于其附近区域二型花居群的主要原因。

本研究中,秋浦河流域上游的池州市石台县莲花田(LHT)和池州市石台县立新村(LXC)居群的遗传多样性均较高,且由这 2 个居群向其他居群的基因流较大,说明研究区域内的安徽羽叶报春居群的遗传多样性与居群位置有一定关系,建议加强对秋浦河流域上游安徽羽叶报春居群的保护,尤其应注意对居群生境的保护。位于秋浦河流域下游低矮丘陵山区的 FHS 和 YS 居群为同型花居群,其繁育系统已经变为自交繁育,与二型花居群的繁育系统(异交繁育)已经明显不同,且与二型花居群间存在明显的基因流屏障,因此,建议将其视为不同于二型花居群的独立单元来进行遗传保护。

#### 参考文献:

- [1] BARRETT S C H, JESSON L K, BAKER A M. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants[J]. *Annals of Botany*, 2000, 85(Supplement A): 253-265.
- [2] NOWAK M D, RUSSO G, SCHLAPBACH R, et al. The draft genome of *Primula veris* yields insights into the molecular basis of heterostyly[J]. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 12.
- [3] DARWIN C. On the two forms, or dimorphic condition, in the species of *Primula*, and on their remarkable sexual relations[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1862, 6(22): 77-96.
- [4] BARRETT, S C H, SHORE J S. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics[M]//FRANKLIN-TONG V E. *Self-incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Berlin: Springer-Verlag, 2008: 3-32.
- [5] PIPER J G, CHARLESWORTH B, CHARLESWORTH D. Breeding system evolution in *Primula vulgaris* and the role of reproductive

- assurance[J]. *Heredity*, 1986, 56(2): 207-217.
- [6] ECKERT C G, KALISZ S, GEBER M A, et al. Plant mating systems in a changing world[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2010, 25(1): 35-43.
- [7] KELSO S. The genus *Primula* as a model for evolution in the Alaskan flora[J]. *Arctic and Alpine Research*, 1992, 24(1): 82-87.
- [8] MAST A R, KELSO S, CONTI E. Are any primroses (*Primula*) primitively monomorphic?[J]. *New Phytologist*, 2006, 171(3): 605-616.
- [9] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第五十九卷第二分册[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 55-57.
- [10] RICHARDS J. *Primula* [M]. Portland: Timber Press, 2003: 1-69.
- [11] 张小平, 陈明林. 安徽羽叶报春与毛茛叶报春的遗传多样性研究与新资源评估[J]. *植物资源与环境学报*, 2003, 12(3): 1-5.
- [12] 杜丹丹, 邵剑文. 中国特有濒危植物安徽羽叶报春的研究现状及展望[J]. *安徽师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 33(6): 562-565.
- [13] 陈明林, 张小平, 李晓红. 安徽羽叶报春和毛茛叶报春的微形态特征[J]. *植物资源与环境学报*, 2004, 13(3): 18-24.
- [14] 陈明林, 张小平, 孟凡庭. 皖南奇葩: 安徽羽叶报春[J]. *植物杂志*, 2001(2): 6-7.
- [15] SHAO J W, WANG J, XU Y N, et al. Genetic diversity and gene flow within and between two different habitats of *Primula merrilliana* (Primulaceae), an endangered distylous forest herb in eastern China[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2015, 179(1): 172-189.
- [16] SHAO J W, CHEN W L, PENG Y Q, et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered and endemic species *Primula merrilliana* in China[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, 37(6): 699-706.
- [17] DOYLE J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [M]//HEWITT G M, JOHNSTON A W B, YOUNG J P W. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin: Springer-Verlag, 1991: 283-293.
- [18] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [19] 邵剑文, 张小平, 张中信, 等. 安徽羽叶报春的有效传粉昆虫及花朵密度和种群大小对传粉效果的影响[J]. *植物分类学报*, 2008, 46(4): 537-544.
- [20] MAYR E. *Animal Species and Evolution* [M]. Cambridge: Harvard University Press, 1963: 226-228.
- [21] WANG D Y, CHEN Y J, ZHU H M, et al. Highly differentiated populations of the narrow endemic and endangered species *Primula cicutarifolia* in China, revealed by ISSR and SSR[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 53(8): 59-68.
- [22] 张大勇. 植物生活史进化与繁殖生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 319-320.
- [23] WILLI Y, MÄÄTTÄNEN K. Evolutionary dynamics of mating system shifts in *Arabidopsis lyrata* [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2010, 23(10): 2123-2131.
- [24] KOELLING V A, HAMRICK J L, MAURICIO R. Genetic diversity and structure in two species of *Leavenworthia* with self-incompatible and self-compatible populations [J]. *Heredity*, 2011, 106(2): 310-318.
- [25] NYBOM H, BARTISH I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2000, 3(2): 93-114.
- [26] HERLIHY C R, ECKERT C G. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant [J]. *Nature*, 2002, 416(6878): 320-323.
- [27] MABLE B K, ADAM A. Patterns of genetic diversity in outcrossing and selfing populations of *Arabidopsis lyrata* [J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(17): 3565-3580.

(责任编辑: 佟金凤)