

# 广西野生濒危植物掌叶木遗传多样性的 ISSR 与 SRAP 分析

李雪萍<sup>1</sup>, 郭松<sup>2,3</sup>, 熊俊飞<sup>1,3</sup>, 郭华伟<sup>1</sup>, 郑琳<sup>1</sup>, 李在留<sup>3,\*</sup>

(<sup>1</sup>河南科技大学林学院, 河南洛阳 471003; <sup>2</sup>南京林业大学江苏省林业生态工程重点实验室, 南京 210037; <sup>3</sup>广西大学林学院, 南宁 530004)

**摘要:** 采用 ISSR 和 SRAP 技术对中国野生濒危植物掌叶木 [*Handeliodendron bodinieri* (Lévl.) Rehd.] 的 5 个野生居群的 95 份材料进行分析, 10 条 ISSR 引物共扩增得到 114 个条带, 其中多态性条带 68 个, 多态性条带百分率 (PPB) 59.65%, 掌叶木在物种水平上的 Nei's 基因多样性 ( $H$ ) 为 0.1817, Shannon's 遗传多样性信息指数 ( $I$ ) 为 0.2792; 观测等位基因数 ( $N_a$ ) 为 1.5965, 有效等位基因数 ( $N_e$ ) 为 1.2984, 居群间基因间分化度 ( $G_{st}$ ) 为 35.17%。15 组 SRAP 引物共扩增出 292 个条带, 其中多态性条带 269 个, 多态性条带百分比为 92.12%, 物种水平上, 掌叶木的 Nei's 基因多样性 ( $H$ ) 为 0.3171, Shannon's 遗传多样性信息指数 ( $I$ ) 为 0.4758; 观测等位基因数 ( $N_a$ ) 为 1.9212, 有效等位基因数 ( $N_e$ ) 为 1.5380, 居群间基因间分化度 ( $G_{st}$ ) 为 23.17%。结果显示两种标记均能检测到掌叶木具有较高的遗传多样性, 掌叶木不同居群间存在一定的遗传分化和基因流动, 但遗传分化主要存在于居群内。

**关键词:** 掌叶木; ISSR; SRAP; 遗传多样性; 居群; 遗传分化

**中图分类号:** S 68

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2015) 02-0386-09

## Genetic Diversity of the Endangered *Handeliodendron bodinieri* in Guangxi Province by ISSR and SRAP Analysis

LI Xue-ping<sup>1</sup>, GUO Song<sup>2,3</sup>, XIONG Jun-fei<sup>1,3</sup>, GUO Hua-wei<sup>1</sup>, ZHENG Lin<sup>1</sup>, and LI Zai-liu<sup>3,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; <sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Forestry Ecological Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; <sup>3</sup>College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** Genetic diversity of 95 samples of five natural populations of the endangered plant *Handeliodendron bodinieri* (Lévl.) Rehd. was analyzed by using ISSR and SRAP techniques. A total of 114 bands were obtained with 10 ISSR primers, of which 68 bands were polymorphic with a polymorphic proportion of 59.65%. At the species level, the Nei's genetic diversity ( $H$ ) was 0.1817, and Shannon's information index ( $I$ ) was 0.2792. The observed number of alleles was 1.5965 and the effective number of alleles was 1.2984. The differentiation coefficient ( $G_{st}$ ) among the populations was 35.17%. Totally, 292 bands were obtained with 15 SRAP primer pairs, and 269 bands were polymorphic with a proportion of

收稿日期: 2014-09-01; 修回日期: 2015-02-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060053); 河南省自然科学基金项目 (62580021); 广西自然科学基金项目 (2011GXNSFB018016)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lizailiu666@163.com)

92.12%. The Nei's genetic diversity ( $H$ ) was 0.3171, and the Shannon's information index ( $I$ ) was 0.4758. The observed number of alleles was 1.9212 and the effective number of alleles was 1.5380. The differentiation coefficient ( $G_{st}$ ) among the populations by SRAP analysis was 23.17%. The results showed that both methods could be used to determine the genetic diversities among different populations of *H. bodinieri*. There was a high genetic diversity in *H. bodinieri*, and genetic differentiation and gene flow existed between the populations, but the main genetic differentiation occurred largely within the population.

**Key words:** *Handeli dendron bodinieri*; ISSR; SRAP; genetic diversity; population; genetic differentiation

掌叶木 [*Handeli dendron bodinieri* (Lévl.) Rehd.] 是无患子科 (Sapindaceae) 掌叶木属落叶乔木, 中国特有的珍稀濒危野生单属种物种 (傅立国和金鉴明, 1992), 第三纪孑遗古老植物。掌叶木高可达 15 m, 掌状叶对生, 具备良好的园林绿化应用价值 (代正福和周正邦, 1999), 且其种子含油量高, 具有木本燃油植物的开发应用潜力 (贾良志和周俊, 1987; 陈波涛等, 2007)。但是目前该物种分布区狭小, 仅见中国贵州南部以及广西凤山、田林等县零星分布。该物种的自然更新能力极弱, 亟待进行其种质资源保存研究。有关如何繁殖及保护该野生濒危植物, 周洪英和张著林 (2000) 进行了有性繁殖试验, 韦小丽等 (2006) 对其芽苗移栽技术进行了报道, 黄仕训等 (2002)、张著林和林昌虎 (2006) 对其迁地保护进行了初步摸索, 有关其种群生态 (常进雄等, 2002)、种子生态 (熊志斌等, 2003)、生物学特性调查研究 (曹丽敏等, 2006) 等方面已有报道。其分子生物学方面的研究相对滞后, 仅见 Wang 等 (2008)、贺瑞坤等 (2011) 进行了掌叶木微卫星分子标记的相关开发研究及遗传多样性的初步分析。

作者在前期 ISSR 和 SRAP (Zietkiewicz et al., 1994; Huang et al., 2013; Zhao et al., 2013; Harish et al., 2014) 体系优化建立工作的基础上 (李雪萍等, 2011, 2013), 采用这两种标记技术对掌叶木的主要分布地——广西境内的 5 个野生居群进行研究, 通过两种分子标记的分析结果, 探索掌叶木的遗传多样性和遗传结构, 为掌叶木的有效保护和合理开发应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2011—2012 年春天采集广西乐业、凤山两地 5 个居群的 95 个样本 (表 1), 其中凤山巴腊猴山 (B 和 C)、中亭乡 (D 和 E) 的两个居群间隔有山头。取健康叶片, 于冰壶中带回实验室或取枝条带回后将叶片用液氮速冻后置于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存备用。

表 1 采集地信息  
Table 1 Description of the populations analyzed

代号 Code	地点 Sampling locality	海拔/m Altitude	样本数量 Sampling size
A	乐业梅家山庄 Meijia Villa, Leye County	1 000 ~ 1 200	29
B	凤山巴腊猴山① Monkey Mountain of Bala, Fengshan County①	800 ~ 890	18
C	凤山巴腊猴山② Monkey Mountain of Bala, Fengshan County②	800 ~ 900	19
D	凤山县中亭乡① Zhongting Village, Fengshan County①	800 ~ 880	12
E	凤山县中亭乡② Zhongting Village, Fengshan County②	800 ~ 880	17

## 1.2 ISSR 分析

采用李雪萍等 (2011) 建立的适合掌叶木的 ISSR-PCR 体系方法进行操作。25  $\mu\text{L}$  的反应体系包括: 模板 DNA 30 ng,  $\text{Mg}^{2+}$  2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 引物 0.8  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTP 0.20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA 聚合酶 1.5 U。扩增程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 44 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 3  $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$  恒定电压下电泳约 1 h, 自动凝胶成像系统 (UVItec) 拍照记录。

100 条 ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学提供的序列, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。扩增反应在 SENSQUEST LAB CYCLER 基因扩增仪上进行, 所用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 均为 TaKaRa 公司产品。从 100 条 ISSR 引物中筛选能扩增出清晰明亮谱带且重复性好的 10 条引物 (表 2) 对所有个体进行 ISSR-PCR 扩增。

表 2 所用 ISSR 引物详细信息  
Table 2 List of ISSR primers used in the study

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTGTYG
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	UBC857	ACACACACACACACACYG
UBC828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	UBC861	ACCACCACCACCACCACC
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	UBC866	CTCCTCTCTCTCTCTCTC

Y = T/C.

## 1.3 SRAP 分析

参照已优化建立的适合掌叶木的 SRAP 体系 (李雪萍 等, 2013) 进行试验。20  $\mu\text{L}$  体系包括: 模板 DNA 20 ng,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度 2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 引物浓度 0.6  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTP 0.20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA 聚合酶 1.5 U。扩增程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 50 s, 35  $^{\circ}\text{C}$  退火 50 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 50 s, 5 个循环; 退火温度梯度升高到 50  $^{\circ}\text{C}$ , 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物采用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色, 高清数码相机拍照记录。从 10 个正向引物和 10 个反向引物 (表 3) 组合成的 100 对引物组合中进行筛选。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 3 SRAP 引物序列  
Table 3 Sequences of primers used in SRAP analysis

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')
Em1	GACTGCGTACGAATT AAT	Me1	TGAGTCCAA ACCGGATA
Em2	GACTGCGTACGAATT TGC	Me2	TGAGTCCAA ACCGGAGC
Em3	GACTGCGTACGAATT GAC	Me3	TGAGTCCAA ACCGGAAT
Em4	GACTGCGTACGAATT TGA	Me4	TGAGTCCAA ACCGGACC
Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA
Em7	GACTGCGTACGAATTATG	Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC
Em8	GACTGCGTACGAATTAGC	Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC
Em9	GACTGCGTACGAATTACG	Me9	TGAGTCCAAACCGGTAG
Em10	GACTGCGTACGAATTAG	Me10	TGAGTCCAAACCGGCAT

## 1.4 数据分析

根据电泳图条带的有无进行 1、0 记数, 在相同迁移位置上有条带记为 1、无条带记为 0, 形成

0/1 矩阵图输入计算机。采用 POPGENE Version1.31 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、Shannon's 遗传多样性信息指数、观测等位基因数、有效等位基因数、居群内基因多样性、居群间基因多样性、居群遗传距离与遗传一致性等。采用 NTSys2.0 中 SHAN 程序对经 Lynch-Milligan 校正过的 Nei 无偏遗传距离构建居群间 UPGMA 聚类图 (Joanne, 2000; Tang et al., 2003)。运用 SPSS13.0 进行居群遗传距离的相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 掌叶木遗传多样性的 ISSR 分析

10 条 ISSR 引物在 95 个样本中共检测到 114 个条带 (片段大小在 200 ~ 2 000 bp 之间), 每条引物扩增出 8 ~ 16 个条带。其中多态性条带 68 个, 多态性条带百分率 (PPB) 为 59.65%, 但在居群水平上 PPB 介于 21.05% ~ 41.23% 之间 (表 4)。掌叶木在物种水平上的 Nei's 基因多样性 ( $H$ ) 为 0.1817, Shannon's 指数 ( $I$ ) 为 0.2792。观测等位基因数 ( $N_a$ ) 为 1.5965, 有效等位基因数 ( $N_e$ ) 为 1.2984。而各居群的  $H$  为 0.0868 ~ 0.1542, 平均  $H$  为 0.1147, 各居群的  $I$  为 0.1265 ~ 0.2271, 平均  $H$  为 0.1684,  $N_a$  为 1.2105 ~ 1.4123,  $N_e$  为 1.1617 ~ 1.2710 (表 4)。

表 4 各居群遗传变异的 ISSR 分析  
Table 4 Genetic variation of different populations by ISSR analysis

居群 Population	多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic band (PPB)	观测等位基因数 Observed number of alleles ( $N_a$ )	有效等位基因数 Effective number of alleles ( $N_e$ )	Nei's 基因多样性 Nei's genic diversity ( $H$ )	Shannon's 指数 Shannon's information index ( $I$ )
A	41.23	1.4123	1.2710	0.1542	0.2271
B	28.07	1.2807	1.1746	0.1001	0.1482
C	28.07	1.2807	1.1696	0.0972	0.1446
D	33.33	1.3333	1.2455	0.1351	0.1956
E	21.05	1.2105	1.1617	0.0868	0.1265
平均 Average	30.35	1.3035	1.2045	0.1147	0.1684
物种水平 Species level	59.65	1.5965	1.2984	0.1817	0.2792

分析显示, 掌叶木总的居群基因多样性 ( $H_t$ ) 为 0.1769, 居群内的基因多样性 ( $H_s$ ) 为 0.1147, 居群间基因间分化度 ( $G_{st}$ ) 为 35.17%, 基因流 ( $N_m$ ) 为 0.9218。利用 POPGENE 计算居群间 Nei 无偏遗传距离与遗传一致性时, 两两居群间 ISSR 分析的遗传距离以凤山县中亭乡两个居群 (D 居群和 E 居群) 的遗传距离最小 (0.0538), 凤山县巴腊猴山一居群 (C 居群) 与凤山县中亭乡一居群 (E 居群) 间的遗传距离最大 (0.1106) (表 5)。基于 Nei 无偏遗传距离构建了居群间 UPGMA 聚类图 (图 1)。

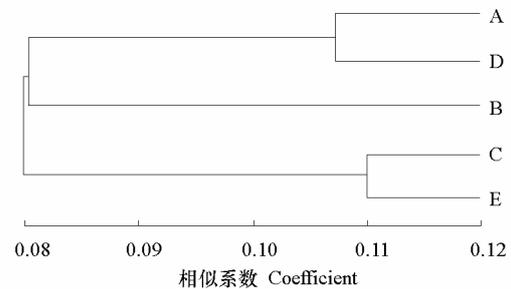


图 1 掌叶木基于 ISSR 分析的 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图  
Fig. 1 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distance among populations of *H. bodinieri* by ISSR analysis

表5 各居群 Nei's 无偏遗传距离 (左下角) 与遗传一致性 (右上角) 的 ISSR 分析  
Table 5 Nei's unbiased measures of genetic distance (below diagonal) and genetic identity  
(above diagonal) of the populations by ISSR analysis

居群 Population	A	B	C	D	E
A	-	0.9101	0.9198	0.8974	0.8707
B	0.0942	-	0.9426	0.9384	0.9065
C	0.0836	0.0591	-	0.9296	0.8953
D	0.1083	0.0636	0.0730	-	0.9476
E	0.1051	0.0981	0.1106	0.0538	-

## 2.2 掌叶木遗传多样性的 SRAP 分析

从 100 个 SRAP 引物中筛选出 14 组引物 (Em3-Me1、Em3-Me7、Em4-Me9、Em5-Me5、Em5-Me6、Em5-Me8、Em5-Me10、Em6-Me6、Em6-Me9、Em7-Me2、Em7-Me3、Em7-Me8、Em10-Me3、Em10-Me9) 对掌叶木所有个体进行了 SRAP-PCR 扩增。共得到大小在 50 ~ 500 bp 之间的条带 292 个, 其中多态性条带 269 个, 多态性条带百分率 (PPB) 为 92.12%。居群水平上, 各居群的多态性条带百分率介于 56.16% ~ 81.16% 之间 (表 6)。

在物种水平上, 掌叶木的  $H$ 、 $I$ 、 $N_a$  和  $N_e$  分别为 0.3171、0.4758、1.9212 和 1.5380。各居群的  $H$  为 0.1942 ~ 0.2916 (平均为 0.2402), 而  $I$  为 0.2891 ~ 0.4352 (平均为 0.3585),  $N_a$  与  $N_e$  分别为 1.5616 ~ 1.8116 和 1.3388 ~ 1.5094 (表 6)。

表6 各居群遗传变异的 SRAP 分析  
Table 6 Genetic variation of different populations by SRAP analysis

居群 Population	多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic band (PPB)	观测等位基因数 Observed number of alleles ( $N_a$ )	有效等位基因数 Effective number of alleles ( $N_e$ )	Nei's 基因多样性 Nei's genic diversity ( $H$ )	Shannon's 指数 Shannon's information index ( $I$ )
A	81.16	1.8116	1.4967	0.2916	0.4352
B	70.21	1.7021	1.3820	0.2253	0.3411
C	78.77	1.7877	1.5094	0.2904	0.4285
D	57.53	1.5753	1.3423	0.1996	0.2985
E	56.16	1.5616	1.3388	0.1942	0.2891
平均 Average	68.77	1.6877	1.4138	0.2402	0.3585
物种水平 Species level	92.12	1.9212	1.5380	0.3171	0.4758

SRAP 分析显示掌叶木总的居群基因多样性 ( $H_t$ ) 为 0.3127, 居群内的基因多样性 ( $H_s$ ) 为 0.2402, 居群间基因间分化度 ( $G_{st}$ ) 为 23.17%, 基因流 ( $N_m$ ) 为 1.6575。

居群间的分析结果 (表 7) 显示乐业梅家山庄居群 (A 居群) 与凤山县巴腊猴山一居群 (B 居

表7 各居群 Nei's 无偏遗传距离 (左下角) 与遗传一致性 (右上角) 的 SRAP 分析  
Table 7 Nei's unbiased measures of genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal)  
of the populations by SRAP analysis

居群 Population	A	B	C	D	E
A	-	0.9498	0.9282	0.8813	0.8571
B	0.0515	-	0.9278	0.8744	0.8604
C	0.0745	0.0749	-	0.8539	0.8496
D	0.1264	0.1343	0.1580	-	0.9181
E	0.1542	0.1503	0.1630	0.0855	-

群)间遗传距离最小(0.0515), 而遗传距离最大的两个居群也是凤山县巴腊猴山一居群(C居群)与凤山县中亭乡一居群(E居群)间的遗传距离最大(0.1630), 基于 Nei 无偏遗传距离构建居群间 UPGMA 聚类图见图 2。

### 2.3 两种标记的综合分析

10 条 ISSR 引物和 15 对 SRAP 引物共扩增得到 406 个条带, 其中多态性条带 337 个, 多态性条带百分率为 83%。在物种水平上, 掌叶木的 Nei's 基因多样性 ( $H_s$ ) 为 0.2789,  $I$  为 0.4204,  $N_a$  为 1.8300,  $N_e$  为 1.4703。总的居群基因多样性 ( $H_t$ ) 0.2742, 居群内的  $H_s$  为 0.2047, 居群间基因间分化度 ( $G_{st}$ ) 为 25.39%, 基因流 ( $N_m$ ) 为

1.4692。与 ISSR 和 SRAP 两种标记单独分析的结果一致, 均说明这 5 个掌叶木居群间缺乏有效的基因交流, 基因流动较小, 居群间存在一定的遗传分化, 遗传变异主要存在于居群内部。聚类分析均显示同处凤山县的巴腊猴山中的 C 居群与中亭乡的 E 居群间的遗传距离最大, 而两个巴腊猴山居群并未显示遗传距离最小, 说明掌叶木居群间的遗传变异与其地理分布无直接相关性。

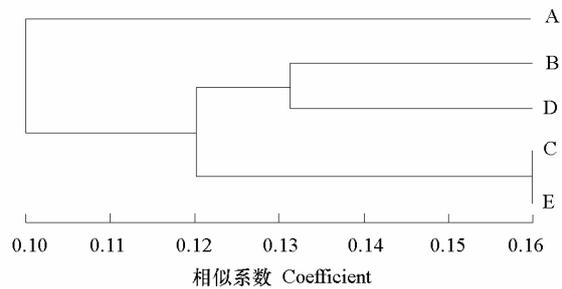


图 2 掌叶木基于 SRAP 分析的 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distance among populations of *H. bodinieri* by SRAP analysis

## 3 讨论

### 3.1 不同标记检测结果的评价

ISSR 和 SRAP 作为重复性高、操作相对便捷的两种分子标记技术, 近年来被广泛用于濒危物种的遗传多样性分析中。本研究中借助 ISSR 和 SRAP 技术对掌叶木的 5 个野生居群进行遗传多样性的分析显示, 虽然两种标记得到的遗传距离的相关性很低 ( $r = 0.407$ ,  $P = 0.243$ ), 但两种标记对掌叶木物种水平上、居群水平上的遗传变异与居群间的遗传距离等相关指标的变化趋势基本一致, 均能够用于该物种的遗传变异的相关分析, 与甜瓜 (Yildiz et al., 2011)、山野大豆 (Liu et al., 2013) 的研究报道接近。由于 ISSR 是针对整个植物基因组序列进行的扩增, 且扩增结果受引物选择性的影响, 而 SRAP 是针对基因组中的 ORF 区域, 且 ISSR 一般多用琼脂糖电泳检测, 而 SRAP 多用聚丙烯酰胺电泳检测, 因此两种标记间并非一定存在较高的相关性。两种标记的综合分析显示, SRAP 标记更适合用于探讨掌叶木的遗传多样性。此外, 亦有报道支持应该采用两种标记综合进行物种遗传变异的分析 (Wang et al., 2012; Liu et al., 2013), 以增强其结果的准确性。

### 3.2 掌叶木的濒危机制与保护

在对物种实施保护计划的过程中, 必须在该物种群体遗传学研究的前提下, 来考虑采取什么样的保护策略和措施。掌叶木作为亚热带南部喀斯特山地常绿落叶阔叶混交林的特有树种之一, 随着喀斯特森林植物的大面积被破坏, 现仅零散分布于贵州南部和广西西部。加之掌叶木现为野生状态, 不为人们所重视, 人为破坏严重, 自然资源稀缺, 急需加以保护。

本研究的分析结果显示, 掌叶木具有较高的遗传多样性 (SRAP 分析  $PPB$  为 92.12%、 $H$  为 0.3171、

$I$  为 0.4758)。一般认为广布种具有较高的遗传多样性(王永清等, 2010; Liao et al., 2012; Chen et al., 2013), 而稀有的或分布区狭窄的物种遗传多样性水平偏低(汪小全等, 1996; Xiao et al., 2004; 李群等, 2005), 但越来越多的研究表明, 一些特有种、狭域种甚至濒危种也能保持较高的遗传多样性, 如濒危植物太行花 (*Taihangia rupestris*)  $PPB$  为 80.43%,  $H$  为 0.2479,  $I$  为 0.3785 (Wang et al., 2011); 珙桐  $PPB$  为 96.44%,  $H$  为 0.3429,  $I$  为 0.5107 (李雪萍等, 2012); *Commiphora wightii*  $PPB$  为 86.72%,  $H$  为 0.294,  $I$  为 0.439 (Harish et al., 2014), 均保持着较高的遗传多样性, 即认为物种本身的遗传变异较高, 其濒危不是由于其遗传多样性的丧失而造成的。陈发菊等(2007)对濒危植物巴东木莲的研究发现, 其种子不同部位均存在萌发抑制物, 以致对胚的萌发产生重要影响。本课题组对掌叶木种子生物学的研究发现, 掌叶木的种皮中亦存在有萌发抑制物, 因此可能导致该物种有性繁殖困难, 继而成为其濒危的内部因素。

影响物种居群间遗传分化因素有该物种的进化历史、突变、重组、遗传漂变、繁育系统、基因流以及自然选择等因素(Liu et al., 2013; Viki et al., 2013)。繁育系统在物种进化中起着最根本的作用, 产生各种自然选择基因型, 不同的繁育方式可产生不同比例的杂合与纯合基因型, 从而决定遗传变异居群内与居群间的分布, 影响居群的遗传学结构(Wang et al., 2011; Andrea et al., 2014)。

掌叶木为多年生大乔木, 世代重叠, 在长期进化的过程中, 适应其生存的基因能够积累和保留下来, 形成了其不同居群间的遗传基础。掌叶木的花数量较大, 且单花较小, 具有风媒花植物的特征, 但本课题组对其繁育系统的研究发现, 该物种属专性杂交, 部分自交亲和, 传粉过程需要传粉者, 但由于其所处山区, 加之生境破坏严重, 传粉昆虫种类不多。此外, 掌叶木的花期在每年的 4—5 月, 山区天气变化频繁, 花粉的扩散与传播受风、雨等天气影响明显。加之掌叶木的种子常被动物嚼食, 且极易霉变, 因此, 掌叶木不同居群间缺乏有效的基因交流, 基因流较小。

基于本研究及前人的研究结果, 今后对该野生濒危植物的保护与应用提出以下建议: (一) 由于掌叶木绝大部分的遗传变异存在于居群内, 因此首先要做好就地保护, 坚决杜绝乱砍滥伐、垦荒、放牧的发生, 减少人为的生境破坏, 恢复种群规模; (二) 对掌叶木进行迁地保护, 通过将掌叶木引栽入植物园、公园等, 使人们对该物种有更多的感性认识, 通过宣传教育, 特别是对依赖生物资源生存的山区民众和私营部分, 使大家能够自觉形成保护濒危物种的意识, 参与到掌叶木的保护和管理工作中; (三) 加强掌叶木繁殖生物学的相关研究, 扩大种群数量。

## References

- Andrea C, Lorenza C, Alessio M, Fatima P, Gordana T, Federico S. 2014. Low genetic diversity and contrasting patterns of differentiation in the two monotype genera *Halacsya* and *Paramoltkia* (Boraginaceae) endemic to the Balkan serpentine. *Flora*, 209: 5 - 14.
- Cao Li-min, Xia Nian-he, Deng Yun-fei. 2006. Floral organogenesis of *Handeliidendron bodinieri* (Sapindaceae) and its systematic implications. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 44 (4): 393 - 400. (in Chinese)
- 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. *植物分类学报*, 44 (4): 393 - 400.
- Chang Jin-xiong, Yang Long, Huang Wei-lian. 2002. A study on *Handeliidendron* population ecology in South Guizhou. *Guizhou Science*, 20 (2): 1 - 15. (in Chinese)
- 常进雄, 杨龙, 黄威廉. 2002. 贵州南部掌叶木种群生态研究. *贵州科学*, 20 (2): 1 - 15.
- Chen Bo-tao, Yu Jian-ping, Deng Bo-long, Wen Tao. 2007. Analysis of economic character on woody fuel oil plant of *Handeliidendron bodinieri* in Guizhou Pvince. *Resource Development & Market*, 23 (6): 514 - 516. (in Chinese)
- 陈波涛, 郁建平, 邓伯龙, 文 毅. 2007. 贵州木本燃油植物掌叶木的经济性状分析. *资源开发与市场*, 23 (6): 514 - 516.
- Chen Fa-ju, Liang Hong-wei, Wang Xu, He Zheng-quan, Li Feng-lan. 2007. Seed dormancy and germination characteristics of *Manglietia*

- patungensis*, an endangered plant endemic to China. *Biodiversity Science*, 15 (5): 492 - 499. (in Chinese)
- 陈发菊, 梁宏伟, 王旭, 何正权, 李凤兰. 2007. 濒危植物巴东木莲种子休眠与萌发特性的研究. *生物多样性*, 15 (5): 492 - 499.
- Chen S X, Zhou J, Chen Q, Chang Y X, Du J N, Meng H W. 2013. Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm by SRAP. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50: 139 - 146.
- Dai Zheng-fu, Zhou Zheng-bang. 1999. Resources of the wild rare and endangered ornamental plants in the subtropical area of Guizhou Province. *Acta Horticulturae Sinica*, 26 (4): 248 - 254. (in Chinese)
- 代正福, 周正邦. 1999. 贵州亚热带地区的野生珍稀观赏植物资源. *园艺学报*, 26 (4): 248 - 254.
- Fu Li-guo, Jin Jian-ming. 1992. China plant red data book: Rare and endangered plants (Book I). Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 傅立国, 金鉴明. 1992. 中国植物红皮书——稀有濒危植物. 第1册. 北京: 科学出版社.
- Harish, Amit K G, Mahendra P, Manoj K R, Narpal S S. 2014. Conservation genetics of endangered medicinal plant *Commiphora wightii* in India Thar Desert. *Gene*, 535 (2): 266 - 272.
- He Rui-kun, Wang Jing, Huang Hong-wen. 2011. Isolation of novel microsatellite loci for *Handeliidendron bodinieri* (Sapindaceae), an endangered tree endemic to Karst Forest in Southwestern China. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 19 (6): 493 - 498. (in Chinese)
- 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. *热带亚热带植物学报*, 19 (6): 493 - 498.
- Huang C Q, Liu G D, Bai C J, Wang W Q. 2013. Genetic relationship of *Cynodon arcuatus* from different regions of China revealed by ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 162: 172 - 180.
- Huang Shi-xun, Luo Wen-hua, Tang Wen-xiu, Zhou Tai-jiu, Wang Yan, Jiang Neng. 2002. Study on the adaptability of the rare and threatened limestone plants ex-situ conservation. *Guihaia*, 22 (2): 136 - 139. (in Chinese)
- 黄仕训, 骆文华, 唐文秀, 周太久, 王燕, 蒋能. 2002. 石山稀有濒危植物迁地保护适应性研究. *广西植物*, 22 (2): 136 - 139.
- Jia Liang-zhi, Zhou Jun. 1987. Oil plants in China. Beijing: Science Press: 334 - 335. (in Chinese)
- 贾良志, 周俊. 1987. 中国油脂植物. 北京: 科学出版社: 334 - 335.
- Joanne A L. 2000. Software for population genetic analyses of molecular marker data. *Crop Science*, 40 (6): 1521 - 1528.
- Li Qun, Xiao Meng, Guo Liang, Li Jing, Duan Wen-xia, Chen Fang, Wang Li. 2005. Genetic diversity of the rare and endangered plant *Trillium tschonoskii* in Sichuan Province. *Journal of Beijing Forestry University*, 27 (4): 1 - 6. (in Chinese)
- 李群, 肖猛, 郭亮, 李静, 段文霞, 陈放, 王丽. 2005. 四川省珍稀濒危植物延龄草遗传多样性分析. *北京林业大学学报*, 27 (4): 1 - 6.
- Li Xue-ping, Li Zai-liu, Cui bin-bin, He Chun-ling, Peng Jian, Yang Ting, Zhou Zhen-yan. 2011. Optimization of ISSR-PCR amplification in *Handeliidendron bodinieri* (Lévl.) Rehd. *Biotechnology Bulletin*, 230 (9): 167 - 170. (in Chinese)
- 李雪萍, 李在留, 崔彬彬, 贺春玲, 彭健, 杨婷, 周振艳. 2011. 野生濒危植物掌叶木的 ISSR-PCR 反应体系的建立. *生物技术通报*, 230 (9): 167 - 170.
- Li Xue-ping, Li Zai-liu, He Chun-ling, Zhu Wen-yan, Gao Shui-ping. 2012. Genetic diversity of the endangered *Davidia involucreta* by AFLP analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (5): 992 - 998. (in Chinese)
- 李雪萍, 李在留, 贺春玲, 朱文琰, 高水平. 2012. 珙桐遗传多样性的 AFLP 分析. *园艺学报*, 39 (5): 992 - 998.
- Li Xue-ping, Miao Chang-sheng, Zhu En-zuo, He Chun-ling, Li Zai-liu. 2013. Optimization of SRAP-PCR amplification in *Handeliidendron bodinieri* (Lévl.) Rehd. *Journal of Central South University of Forestry and Technology*, 33 (9): 18 - 21. (in Chinese)
- 李雪萍, 苗昌盛, 朱恩作, 贺春玲, 李在留. 2013. 野生濒危植物掌叶木的 SRAP-PCR 体系的建立. *中南林业科技大学学报*, 33 (9): 18 - 21.
- Liao L, Guo Q S, Wang Z Y, Liu L, Zhu Z B. 2012. Genetic diversity analysis of *Prunella vulgaris* in China using ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45: 209 - 217.
- Liu Y, Zhang J M, Wang X G, Liu F, Shen Z B. 2013. Genetic diversity in *Vicia amoena* (Fabaceae) germplasm resource in China using SRAP and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 51: 86 - 93.
- Tang T, Zhong Y, Jian S G, Zhong Y. 2003. Genetic diversity of *Hibiscus tiliaceus* (Malvaceae) in China assessed using AFLP markers. *Annals of*

- Botany, 92: 409 - 414.
- Viki M, Suman K, Pramod T. 2013. SPAR methods revealed high genetic diversity within populations and high gene flow of *Vanda coerulea* Griff ex Lindl (Blue Vanda), an endangered orchid species. *Gene*, 519 (1): 91 - 97.
- Wang H W, Fang X M, Ye Y Z, Cheng Y Q, Wang Z S. 2011. High genetic diversity in *Taihangia rupestris* Yu et Li, a rare cliff herb endemic to China, based on inter-simple sequence repeat markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 553 - 561.
- Wang J, Gao P X, Kang M. 2008. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered tree *Handeliidendron bodinieri* (Sapindaceae). *Conservation Genetics*, 9 (3): 727 - 729.
- Wang Xiao-quan, Zou Yu-ping, Zhang Da-ming, Hong De-yuan, Liu Zheng-yu. 1996. Genetic diversity of the endangered *Cathaya argyrophylla* by RAPD analysis. *Science in China: Series C*, 26 (5): 436 - 441. (in Chinese)
- 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 洪德元, 刘正宇. 1996. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. *中国科学: C 辑*, 26 (5): 436 - 441.
- Wang Yong-qing, Fu Yan, Yang Qin, Luo Nan, Deng Qun-xian, Yan Juan, Zeng Jian-guo, Ruan Guang-lun. 2010. Genetic diversity of *Eriobotrya* analysis by ISSR markers. *Scientia Silvae Sinicae*, 46 (4): 49 - 57. (in Chinese)
- 王永清, 付燕, 杨琴, 罗楠, 邓群仙, 严娟, 曾建国, 阮光伦. 2010. 枇杷属植物遗传多样性的 ISSR 分析. *林业科学*, 46 (4): 49 - 57.
- Wang Z, Wang J, Wang X, Gao H, Dzyubenko N I, Chapurin V F. 2012. Assessment of genetic diversity in *Galega officinalis* L. using ISSR and SRAP markers. *Genet Resour Crop Evol*, 59 (5): 865 - 873.
- Wei Xiao-li, Liao Ming, Zhu Zhong-rong, Jin Tian-xi. 2006. Study on growth regularity and technology of density control of *Handeliidendron bodinieri* (Lévl.) transplant stock using the bud seedling. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 25 (1): 9 - 12. (in Chinese)
- 韦小丽, 廖明, 朱忠荣, 金天喜. 2006. 芽苗移栽掌叶木的生长规律与密度调控技术. *山地农业生物学报*, 25 (1): 9 - 12.
- Xiao L Q, Ge X J, Gong X, Hao G, Zheng S X. 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany*, 94: 133 - 138.
- Xiong Zhi-bin, Ran Jing-cheng, Tan Cheng-jiang, Yu Ping, Qin Huai-zhu, Wei Jia-neng. 2003. The seed ecological characteristics of endangered *Handeliidendron bodinieri*. *Acta Ecologica Sinica*, 23 (4): 820 - 825. (in Chinese)
- 熊志斌, 冉景丞, 谭成江, 玉屏, 覃怀株, 韦加能. 2003. 濒危植物掌叶木种子生态特征. *生态学报*, 23 (4): 820 - 825.
- Yildiz M, Ekbiç E, Keleş D, Sensoy S, Abak K. 2011. Use of ISSR, SRAP, and RAPD markers to assess genetic diversity in Turkish melons. *Scientia Horticulture*, 130: 349 - 353.
- Zhang Zhu-lin, Lin Chang-hu. 2006. Study on the introduction and preservation of *Handeliidendron bodinieri* (Lévl.) Rehd. Wei in allopatry. *Guizhou Science*, 24 (4): 45 - 48. (in Chinese)
- 张著林, 林昌虎. 2006. 掌叶木异地引种保护研究. *贵州科学*, 24 (4): 45 - 48.
- Zhao N, Zhai H, Yu X X, Liu Z S, He S Z, Li Q, Ma D F, Liu Q C. 2013. Development of SRAP markers linked to a gene for stem nematode resistance in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Journal of Integrative Agriculture*, 12 (3): 414 - 419.
- Zhou Hong-ying, Zhang Zhu-lin. 2000. Test and conservation on sexual propagation of *Handeliidendron bodinieri* (Lévl.) Rehd. *Guizhou Forestry Science and Technology*, 28 (4): 30 - 33. (in Chinese)
- 周洪英, 张著林. 2000. 掌叶木有性繁殖试验与观察. *贵州林业科技*, 28 (4): 30 - 33.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176 - 183.