

武陵山区蛇足石杉遗传多样性的 AFLP 分析

黄 骥¹, 陈 浙², 李 菁³, 商晗武²

(1 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234; 2 中国计量学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018; 3 吉首大学 植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南吉首 416000)

摘 要: 采用 AFLP 分子标记对武陵山区蛇足石杉 (*Huperzia serrata*) 4 个居群进行遗传多样性的研究, 结果表明: (1) 7 对引物组合共扩增出条带 615 条, 其中 549 条为多态性条带; 在物种水平上, 多态性条带百分率 $PPB = 89.27\%$, 有效等位基因数 $N_e = 1.257$, Nei's 基因多样性指数 $H = 0.178$, Shannon 多样性信息指数 $I_{sp} = 0.298$; 在居群水平上, $PPB = 71.42\%$, $N_e = 1.235$, $H = 0.154$, Shannon 多样性信息指数 $I_{pop} = 0.251$; 遗传多样性在居群间有明显的差别, 其中坪坝营 (PBY) 居群最高 ($PPB = 81.95\%$), 而铁峰山 (TFS) 居群最低 ($PPB = 64.55\%$)。 (2) 居群间的遗传分化较低, 基于 Nei's 基因多样性分析结果显示, 居群间遗传分化系数 $G_{ST} = 0.159$; Shannon's 居群分化系数 $[(I_{sp} - I_{pop}) / I_{sp}]$ 为 0.16; WINAMOVA 分析显示, 武陵山区蛇足石杉的遗传变异主要存在于居群内, 居群内的遗传变异分量为 65.057, 占总变异的 75.77%, 而居群间的遗传变异分量为 20.804, 占总变异的 24.23%; 居群内存在极显著的遗传分化 ($\Phi_{ST} = 0.242$, $P < 0.001$)。 (3) 由遗传分化系数 (G_{ST}) 估计, 武陵山区蛇足石杉居群间的基因流 $N_m = 2.647$, 表明蛇足石杉属于异交种。 (4) 两两居群间的 Nei's 遗传一致度 (I_N) 范围为 0.031 0 ~ 0.969 4; Mantel 检测结果显示, 居群间的遗传距离与地理距离之间不存在显著的正相关关系 ($r = 0.269$, $P = 0.887$)。 研究认为, 遗传多样性与遗传结构主要决定于居群历史, 较少干扰而稳定的居群偏向克隆生殖, 遗传多样性较低, 而新建居群的遗传多样性则较高; 克隆生长、生态位选择、异交, 以及有效的孢子风媒传播等可能是其维持较高遗传多样性水平的因素, 而过度采挖等人类活动和生境片段化是导致蛇足石杉濒危的主要因素。

关键词: 武陵山区; 蛇足石杉; AFLP; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: Q346⁺.5; Q348

文献标志码: A

Genetic Diversity of *Huperzia serrata* (Huperziaceae) in Wuling Mountains Area Detected by AFLP

HUANG Ji¹, CHEN Zhe², LI Jing³, SHANG Hanwu²

(1 College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2 Key Laboratory of Biome-trology and Inspection and Quarantine, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 3 Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization, Jishou University, Jishou, Hu'nan 416000, China)

Abstract: *Huperzia serrata*, an important traditional Chinese herb, has become a threatened species resulting from over-exploitation and habitat fragmentation in China. We assessed the levels and pattern of the genetic variation within and among four populations of this species in Wuling Mountains area using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. (1) Seven primer combinations used in the study amplified 615 discernible bands with 549 being polymorphic, indicating a considerable high level of specific genetic diversity (at species level; percentage of polymorphic loci $PPB = 89.27\%$, effective number of alleles $N_e = 1.257$, Nei's gene diversity $H = 0.178$, and Shannon's information index $I_{sp} = 0.298$; at population

收稿日期: 2013-09-26; 修改稿收到日期: 2013-10-31

基金项目: 国家自然科学基金 (31260081); 上海市教委科研创新项目 (11YZ91)

作者简介: 黄 骥 (1966—), 男, 博士, 主要从事药用植物资源保护与持续利用方面的研究工作。E-mail: huangji@shnu.edu.cn

level; $PPB=71.42\%$, $N_e=1.235$, $H=0.154$, and Shannon's information index $I_{pop}=0.251$). The differences among populations in levels of genetic diversity were obvious, with the highest level ($PPB=81.95\%$) in PBY population and the lowest level ($PPB=64.55\%$) in TFS population. (2) A low level of genetic differentiation among populations was detected based on Nei's genetic diversity analysis ($G_{ST}=0.159$), Shannon's diversity index (0.16). Further AMOVA analysis also revealed a low level of genetic differentiation among populations ($\Phi_{ST}=0.242$, $P<0.001$). (3) An extraordinarily high level of gene flow ($N_m=2.647$) may result from out-breeding and extensive wind-dispersal spores. (4) Nei's genetic identity (I_N) values between population pairs ranged from 0.927 9~0.969 4. A Mantel test showed no significant correlation between genetic distance and geographical distance ($r=0.269$, $P=0.887$), suggesting that the gene flow be not restricted geographically. In general, population genetic diversity and genetic structure are mainly determined by population history. The level of the genetic diversity in the less disturbed and stable populations which are dominated by clonal reproduction is lower than those of new young populations which are built by sexual reproduction. A number of factors that might affect the genetic profiles of *H. serrata* include clonal growth, selective effect of niche and outcrossing, as well as the effective wind-dispersal of spores.

Key words: Wuling Mountains area; *Huperzia serrata*; AFLP; genetic diversity; genetic structure

蛇足石杉(*Huperzia serrata*)为孢子同型的多年生石松类植物,是石杉科(Huperziaceae)石杉属(*Huperzia*)中蛇足石杉组(Sect. *Serratae*)的模式植物,是一个以2~4回等长二叉分歧、叶缘不皱曲并具粗齿为主要特征的自然类群,广布于东亚、东南亚、太平洋地区、俄罗斯、大洋洲和中美洲。在中国主要分布于长江以南海拔300~2700 m、年均降水量超过1000 mm的亚热带常绿阔叶林区,具有多个种下变异类型^[1-2]。其全草为提取治疗老年性痴呆特效药物石杉碱甲的主要来源^[3]。资源研究显示^[4],蛇足石杉多散生分布于各类群落中的相似生境,因而具有较严苛的“小生境”选择特性,由于生活史过程复杂而漫长,居群自然更新非常缓慢,一经破坏便很难恢复。经近20年的地毯式采收,居群及其生态过程遭到严重破坏,资源量越来越少,残存居群仅剩少量低龄幼苗,较为完好的居群多分布于自然保护区或国家公园,其生存状况已十分严峻。而目前对蛇足石杉除在分类学、资源调查和植物化学等方面有过较多的研究报道外^[2,4-6],其它学科的研究尤其是种内遗传多样性和居群遗传结构等保护生物学的相关研究尚未见报道。

横亘于湘鄂渝黔四省市交界地区的武陵山(27°28'~30°05'N、107°02'~111°33'E)是一个较为完整的地理单元,为“华中植物区系”核心的川东鄂西中心的主体,其区系起源古老、成分复杂、来源多歧、地理过渡明显,是许多古老植物种、属的第四纪冰期避难所,保留着大量的中国特有种、属^[7-8]。由于其气候和植被类型基本涵盖了我国蛇足石杉分布区多样化的生态条件,是该种分布相对集中、种下变异类型

较多的地区,也是目前资源遭到严重破坏的地区之一。因此,本实验采用普遍适用于濒危植物遗传多样性研究的AFLP分子标记技术^[9-11]对武陵山区4个具有典型群落代表意义的蛇足石杉居群的遗传多样性进行了研究,并结合实地调查及以往的研究积累,提出了蛇足石杉的具体保护措施,以期有效地保护和持续利用实践提供基础资料和依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2011年9月,选择4个具有武陵山区典型群落代表意义的居群进行采样(表1,图1),其中,红石林(HSL)居群分布于次生的华千金榆杂木林(*Carpinus cordata* var. *chinensis*)内,持续的采挖活动导致居群个体数量不足60株,且全为2龄级以下幼株;

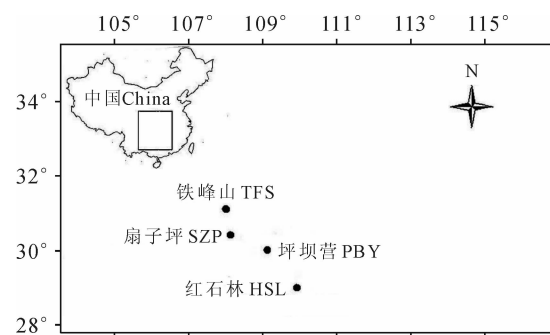


图1 武陵山区蛇足石杉采样居群位置
居群代号同表1

Fig. 1 Geographic location of the sampled populations of *H. serrata* in Wuling Mountains area
The population codes are the same as in Table 1

坪坝营(PBY)居群处于人工杉木林采伐后的一片迹地,全为无分叉的 1 龄幼苗构成,个体数量超过 100 株,由于未发现成年个体,推测该居群可能源于孢子的萌发;扇子坪居群(SZP)位于重庆石柱黄水国家森林公园内,伴生于原生的亮叶水青冈(*Fagus lucida*)群落内,有多达 350 株各龄级个体;铁峰山(TFS)居群则分布于重庆万州铁峰山国有林场人工柳杉林(*Cryptomeria fortunei*)下较阴湿、种间竞争较少的台地上,各龄级个体数量更是达到近 600 株。以上 2 个居群由于受到较好的保护,人为扰动较少,个体数量较多且年龄结构合理,居群中甚至有超过 10 个二叉分枝的丛生个体。

采样时各居群样株间距大于 5 m,以避免采集到亲缘关系较近的个体。采集的新鲜幼嫩叶片立即放入装有硅胶的自封袋中,带回实验室置于-70 ℃冰箱中保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 提取和检测 取 0.5 g 干燥嫩叶,用改良的 CTAB 法^[12]提取基因组 DNA,0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度、完整性和产量,用紫外分光光度计(Spekol-1300)测定其浓度,用 0.1×TE 稀释至 20 ng/μL,保存于-20 ℃冰箱备用。

1.2.2 AFLP 分析 AFLP 分析参照 Vos 等^[9]的方法,仅对体系进行了部分优化。采用 *EcoR* I / *Mse* I (Biolab)酶切组合进行限制性酶切;预扩增反应采用不带任何选择性碱基的引物组合 E00/M00,利用红石林居群 2 组 DNA 样品(HSL1、HSL2)从 36 对 E+3/M+3 引物组合中筛选出扩增图谱清晰的 7 对进行选择性的扩增反应(表 2)。预扩增和选择性的扩增的 PCR 反应均在 Gene Amp PCR System 9600(Perkin Elmer, USA)上进行。所用接头与引物均由上海生工合成,T₄ DNA 连接酶、dNTPs 和

表 1 用于 AFLP 分析的 4 个蛇足石杉天然居群
Table 1 Populations of *H. serrate* for AFLP analyses

居群代号 Population code	地点 Location	居群大小 Population size	采样数 Sample size	海拔 Altitude /m	经纬度 Longitude latitude	群落类型和生境 Community type & habitat
红石林 HSL	湖南古丈红石林 Red Stoneforest, Guzhang County, Hunan	50~70	26	820~920	110°02' E 28°46' N	华千金榆次生杂木林;林缘、岩石及灌丛下阴湿处 Secondary forest (<i>Carpinus cordata</i> var. <i>chinensis</i>); Shade and moist places under rocks or shrubs
坪坝营 PBY	湖北咸丰坪坝营 Pingbaying, Xianfeng County, Hubei	100~120	23	850~950	109°07' E 29°52' N	杉木人工林,采伐后的迹地 Artificial forest (<i>Cunninghamia lanceolata</i>), a cutting blank of the plan- ted China fir
扇子坪 SZP	重庆石柱黄水国家森林公园 Huang- shui National Park, Shizhu County, Chongqing	300~350	26	1 500~1 550	108°24' E 30°04' N	亮叶水青冈原生林,小溪边、岩石及灌丛下阴湿处 Primary forest (<i>Fagus lucida</i>), along the quebrada, on shade and moist places under rocks or shrubs
铁峰山 TFS	重庆万州铁峰山林场 Tiefengshan state forest, Wanzhou City, Chongqing	500~600	25	1 050~1 100	108°08' E 30°48' N	柳杉人工林,林下台地 Artificial forest (<i>Cryptome- ria fortunei</i>), tableland under woods

表 2 AFLP 接头和引物序列
Table 2 The sequence of adapters and primers in the present AFLP experiment

DNA 接头和引物 Adapter and primer		引物编号 Primer code	核苷酸序列 Sequence of the nucleotide acid
<i>EcoR</i> I 接头 <i>EcoR</i> I adapter			5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>Mse</i> I 接头 <i>Mse</i> I adapter			5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
预扩增引物 Primer in pre-amplification	<i>EcoR</i> I	E-00	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'
	<i>Mse</i> I	M-00	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'
选择性扩增引物 Primer in selective amplification	<i>EcoR</i> I +3-CAA	E-CAA	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CCAA-3'
	<i>EcoR</i> I +3-AAT	E-AAT	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AAT-3'
	<i>EcoR</i> I +3-GAA	E-GAA	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C GAA-3'
	<i>EcoR</i> I +3-AGT	E-AGT	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AGT-3'
	<i>Mse</i> I +3-AGT	M-AGT	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A AGT-3'
	<i>Mse</i> I +3-CGC	M-CGC	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CGC-3'
	<i>Mse</i> I +3-CGG	M-CGG	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CGG-3'
	<i>Mse</i> I +3-CTA	M-CTA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CTA-3'

Taq 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。

由于 *EcoR* I / *Mse* I 限制性内切酶的活性温度不同,酶切和连接采用二步法进行。第一步(*Mse* I 酶切):在 0.5 mL 离心管中加入 4.0 μ L 模板 DNA,2.0 μ L 10 \times Buffer,0.5 μ L *Mse* I (10 U/ μ L),用 ddH₂O 补足至 20 μ L,65 $^{\circ}$ C 水浴 4 h;第二步(*EcoR* I 酶切与连接同步):2.0 μ L 10 \times T₄ Buffer,0.5 μ L *EcoR* I (10 U/ μ L),E-adaptor (20 μ mol/L)和 M-adaptor (20 μ mol/L)各 1.0 μ L,0.5 μ L T₄ DNA ligase (5 U/ μ L),用 ddH₂O 补足至 10 μ L 后再加入上述 *Mse* I 酶切产物中,37 $^{\circ}$ C 水浴保温 8 h 以上。

预扩增体系:2.0 μ L 10 \times Buffer,1.6 μ L dNTPs (2.5 mmol/L),0.2 μ L *Taq* 酶 (5 U/ μ L),20 μ mol/L 的 E00 和 M00 引物各 1.0 μ L,DNA 酶切连接产物 4.0 μ L,用 ddH₂O 补足至 20 μ L。预扩增程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 10 min,预扩增产物稀释 20 倍后用于选择性扩增。

选择性扩增体系:2.0 μ L 10 \times Buffer,1.6 μ L dNTPs (2.5 mmol/L),20 μ mol/L 的 E-primer 和 M-primer 各 1.0 μ L,0.2 μ L *Taq* 酶 (5 U/ μ L),4.0 μ L 预扩增产物,用 ddH₂O 补足至 20 μ L。选择性扩增程序:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 1 次,以后每个循环 1 次退火温度降低 0.7 $^{\circ}$ C,执行 13 个循环;在 95 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 下再执行 20 个循环后,72 $^{\circ}$ C 10 min,终止反应。选择性 PCR 产物与双指示剂变性液 (98% 去离子甲酰胺,10 mmol/L EDTA (pH 8.0),0.1% 二甲苯氰和溴酚蓝)按 2.5:1 的比例混合,于 95 $^{\circ}$ C 进行变性 5 min 后立即放置于冰水混合物中。取 6 μ L 热变性后的混合液上样,在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶中 90 W 恒功率电泳约 90 min。电泳结束后采用银染检测法进行 AFLP 指纹显色^[13]。

1.2.3 数据统计分析 采用人工计带法判读电泳图谱中扩增产物和分子量。相同迁移位置上条带有无分别计为 1 和 0,构成 0/1 矩阵。利用 POPGENE 1.31 软件计算以下遗传多样性参数:多态条带百分率 (PPB)、观测等位基因数 (N_o)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性 (H)、Shannon 多样性信息指数 (I ,在物种水平上为 I_{sp} ,在居群水平上为 I_{pop})、居群间遗传分化系数 (G_{ST})、基因流 (N_m)、成对居群间的 Nei's 遗传距离 (D) 和遗传一致性 (I_N),并据此用 UPGMA 方法进行聚类,分析各居

群之间的遗传关系。运用 WINAMOVA 1.55 软件对居群内和居群间的遗传变异进行分子变异分析 (AMOVA),得出居群间遗传分化系数 (Φ_{ST}),WINAMOVA 1.55 软件分析的显著性检验采用 1 000 次置换。POPGENE 1.31 软件和 WINAMOVA 1.55 软件的输入文件由 DCFA 1.1 软件^[14]制作。采用 NTSYSpc 2.11f 软件计算个体间的 Nei & Li 相似性系数^[15],进行个体的 UPGMA 聚类分析。用 NTSYSpc 2.11f 软件的 Mantel 检验居群间遗传距离与地理距离的相关性。

2 结果与分析

2.1 物种和居群水平的 AFLP 遗传多样性

用 7 对引物组合对蛇足石杉 4 个居群的 100 个个体进行扩增,所得片段长度在 90~530 bp 之间。共得到 615 条清晰的条带,其中 549 条为多态性条带。在物种水平上,多态条带百分率为 89.27%,Shannon 多样性信息指数 $I_{sp} = 0.298 \pm 0.194$,Nei's 基因多样性 $H = 0.178 \pm 0.138$,观察等位基因数 $N_o = 1.893 \pm 0.310$,有效等位基因数 $N_e = 1.257 \pm 0.249$ (表 3),表明蛇足石杉在物种水平上具有较高的遗传多样性。

由表 3 可知,各居群多态条带百分率变化范围在 64.55%~81.95% 之间,平均为 71.42%,高低顺序依次为坪坝营>红石林>扇子坪>铁峰山,其中坪坝营居群最高,扇子坪居群 (PPB=65.53%) 与最低的铁峰山居群几乎相同。各居群的 Shannon 多样性信息指数 ($I_{pop} = 0.209 \sim 0.315$)、Nei's 基因多样性 ($H = 0.125 \sim 0.197$)、观察等位基因数 ($N_o = 1.646 \sim 1.819$) 和有效等位基因数 ($N_e = 1.184 \sim 1.306$) 等遗传多样性参数的变化趋势均与多态条带百分率的高低顺序一致。

2.2 居群遗传结构

POPGENE 分析结果表明,武陵山区蛇足石杉 4 个居群间的遗传分化系数 (G_{ST}) 为 0.159,即有 15.9% 的遗传变异存在于居群间,84.1% 的遗传变异存在于居群内,居群内的遗传分化大于居群间的分化。居群间基因流 [$N_m = 0.5(1 - G_{ST})/G_{ST}$] 为 2.647,表明居群间存在较大强度的基因交流。根据 Shannon's 多样性信息指数的分析结果 (表 3),计算出 Shannon's 居群分化系数 [$(I_{sp} - I_{pop})/I_{sp}$] = 0.158,即有 15.8% 的遗传变异分布在居群间,84.2% 的遗传变异分布在居群内部,此结果与 POPGENE 的分析结果几乎一致。

表 3 武陵山区蛇足石杉 4 个居群的遗传多样性水平

居群 Population	样本数 Sample size	多态条带数 No. of polymorphic band	PPB/%	N _o	N _e	H	I
红石林 HSL	26	453	73.66	1.737±0.441	1.233±0.293	0.152±0.159	0.249±0.226
坪坝营 PBY	23	504	81.95	1.819±0.385	1.306±0.307	0.197±0.164	0.315±0.229
扇子坪 SZP	26	403	65.53	1.655±0.476	1.218±0.284	0.142±0.159	0.233±0.230
铁峰山 TFS	25	397	64.55	1.646±0.479	1.184±0.258	0.125±0.145	0.209±0.213
平均 Average	25	439	71.42	1.714±0.445	1.235±0.285	0.154±0.157	0.251±0.225
物种 Species	100	549	89.27	1.893±0.310	1.257±0.249	0.178±0.138	0.298±0.194

注:居群代号同表 1,下图、表等同;PPB.多态条带百分率;N_o.观察等位基因数;N_e.有效等位基因数;H.Nei's 基因多样性;I.Shannon 信息多样性指数。
Note:Population codes are given in Table 1,the figures and tables below are equivalent;PPB. Percentage of polymorphic bands;N_o. Observed number of alleles; N_e. Effective number of alleles;H. Nei's gene diversity;I. Shannon's information index.

表 4 蛇足石杉的 AMOVA 分析

变异来源 Source of variation	自由度 df	总方差 Sum of squares	平均方差 Mean squares	变异组分 Variance components	变异百分率 Percentage of variation/%	P*	Φ _{ST}
居群间 Among populations	3	1 754.199	584.733	20.804	24.23	<0.001	0.242
居群内 Within population	96	6 245.511	65.057	65.057	75.77	<0.001	
总计 Total	99	7 999.710 0					

注:* P 值表示比观察值变异大的概率,这个概率是通过把居群中的样本经过 1 000 次随机排列改变计算得到的;Φ_{ST}.居群间遗传分化系数。
Note:* P-values are the probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone. Probabilities were calculated by 1 000 random permutations of individuals across populations;Φ_{ST}. The coefficient of genetic differentiation among populations.

AMOVA 分析结果(表 4)也显示蛇足石杉的遗传变异主要存在于居群内,占总变异的 75.77%($df=96,P<0.001$),只有 24.23%的变异存在于居群间($df=3,P<0.001$),居群内和居群间的遗传分化均达到极显著水平,AMOVA 估算的居群间遗传分化系数 $\Phi_{ST}=0.242(P<0.001)$ 。

2.3 居群间遗传距离和遗传一致度

由 POPGENE 计算出成对居群间的 Nei's 遗传距离(D)在0.031 0~0.074 8之间,遗传一致度(I_N)的范围为 0.927 9~0.969 4,其中,红石林和坪坝营居群间的遗传一致度最高(I_N=0.969 4),遗传距离最近(D=0.031 0),扇子坪与铁峰山居群间的遗传一致度最低(I_N=0.927 9),遗传距离最远(D=0.074 8)(表 5)。根据 Nei's 遗传距离进行的 UPGMA 聚类分析显示(图 2),在遗传距离 0.040 附近明显分为 3 组:红石林和坪坝营居群聚为一组;扇子坪和铁峰山居群各自单独聚为一组。经 Mantel 检验,居群间地理距离与遗传距离之间不存在显著的正相关关系($r=0.269,P=0.887$)。

2.4 个体的聚类分析

4 个居群 100 个个体进行 Nei & Li 相似性系数的 UPGMA 聚类分析结果显示(图 3),HSL10 与 HSL11 的相似性最高,为0.928 1。在相似性系数

表 5 蛇足石杉 4 个种群间的 Nei's 遗传一致度
(对角线上方)与遗传距离(对角线下方)

Table 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among <i>H. serrata</i> populations				
居群 Population	红石林 HSL	坪坝营 PBY	扇子坪 SZP	铁峰山 TFS
红石林 HSL	—	0.969 4	0.960 9	0.939 0
坪坝营 PBY	0.031 0	—	0.965 7	0.967 2
扇子坪 SZP	0.039 9	0.034 9	—	0.927 9
铁峰山 TFS	0.063 0	0.033 4	0.074 8	—

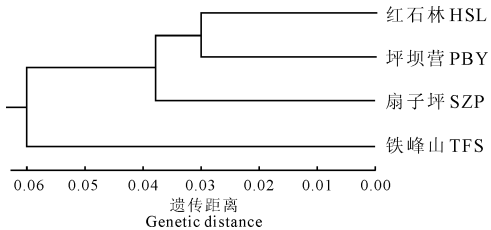


图 2 蛇足石杉居群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of *H. serrata* populations based on Nei's genetic distance

0.6 的附近大致可分为 3 组:坪坝营居群 8 个个体与铁峰山居群全部个体聚为Ⅰ组;坪坝营居群 15 个个体与扇子坪居群 24 个个体聚为Ⅱ组;扇子坪居群

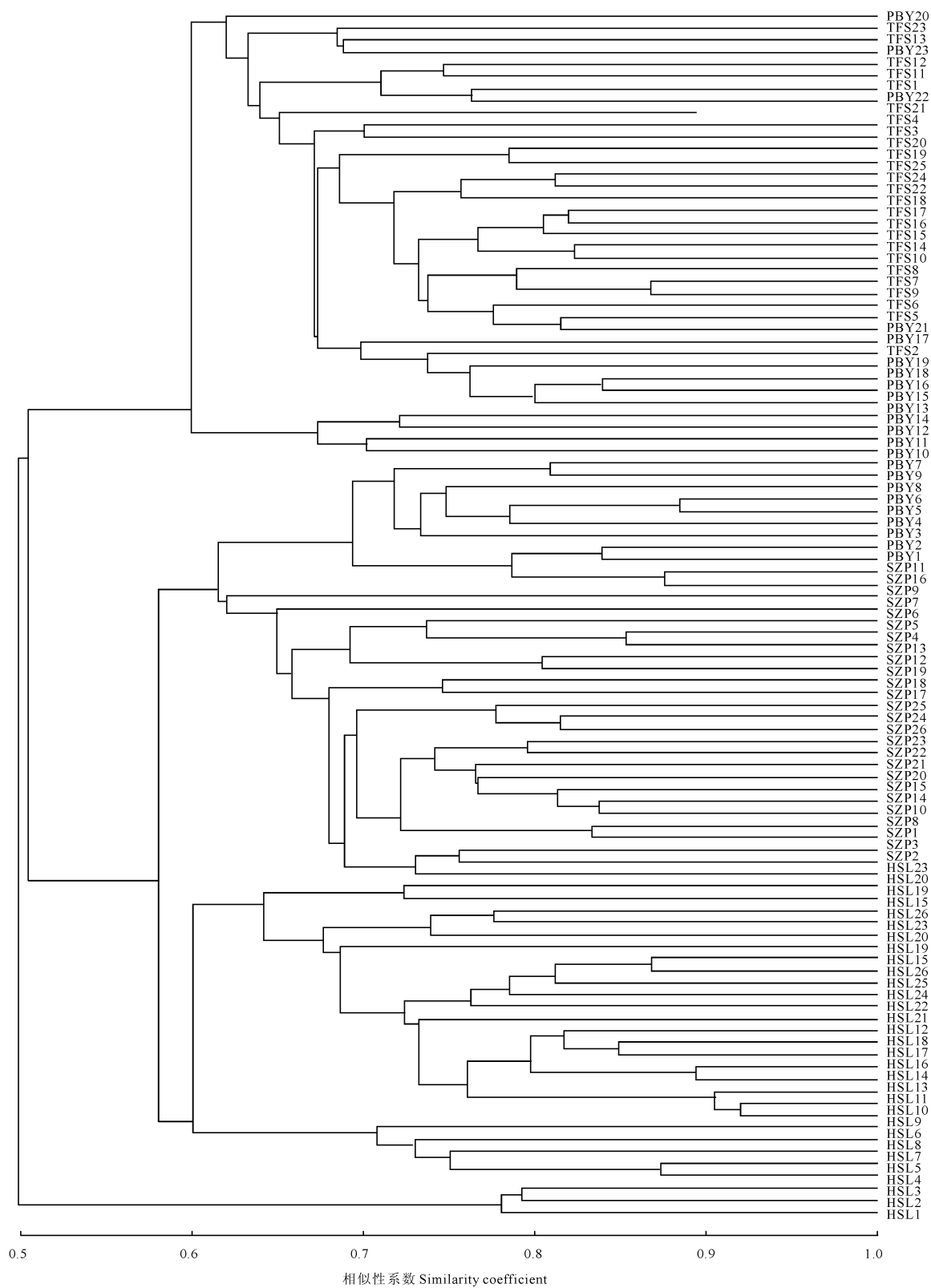


图 3 蛇足石杉各居群个体相似性系数的 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA dendrogram of *H. serrata* based on similarity coefficient

2 个个体与红石林居群全部个体聚为Ⅲ组。结果显示 并没有完全按各自的居群聚类。

示,3 组内居群间的个体都有交迭现象,100 株个体

3 讨 论

3.1 遗传多样性

人类活动所导致的生境片段化甚至丧失,可能使原来广泛连续分布、并具有较高水平遗传多样性的大居群片段化为地理隔离、范围狭小的各个小居群,居群内个体数量减少,尤其是成年个体数量的减少可能造成基因流水平下降,加剧居群内的近交和遗传漂变,从而导致部分遗传多样性丧失^[16],使这些居群具有较高的灭绝风险^[17]。因此,一般认为特有种、濒危种和狭域种的遗传多样性水平较低^[18-20]。

虽然近年来高强度的采挖和生境片段化致使蛇足石杉居群规模变小,野外已很少有成片分布的居群,现存居群多为相互隔离并以幼龄个体为主构成的小居群,但却具有较高水平的遗传多样性。蛇足石杉的遗传多样性不仅远高于已报道的拟蕨类其它濒危物种,如中华水韭(*Isoetes sinensis*) RAPD 标记的 4 个居群 PPB 为 0.81%~12.90%,物种水平 PPB 为 58.6%^[21],AFLP 标记的 7 个居群 PPB 为 25.2%~53.8%,物种水平 PPB 为 61.6%^[11];高寒水韭(*Isoetes hypsophila*) 6 个居群 RAPD 标记的 PPB 为 7.69%~21.96%,物种水平 PPB 为 50.0%^[22],ISSR 标记的 PPB 为 8%~35%,物种水平 PPB 为 82%^[23],而且也高于耳蕨属植物 *Polystichum otomasui*^[24]、观音座莲属植物 *Angiopteris chauliodonta*^[25]、粗梗水蕨(*Ceratopteris pteridoides*)^[26]和水蕨(*Ceratopteris thalictroides*)^[27]等真蕨类物种。

遗传多样性水平在一定程度上反映了物种的繁育系统和交配方式^[28]。虽然对蛇足石杉繁育系统的研究尚未见报道,但结合前人的研究成果,可推测其维持较高遗传多样性的繁育系统类型和可能的交配方式。

Soltis 等^[29]认为,同孢型蕨类藉独立生活的配子体完成受精作用的方式可以有以下 3 种:(1)严格意义上的自交(内配子体交配)^[30],即受精作用发生在由同一配子体产生的精子与卵细胞间;(2)自交,即由同一孢子体上不同孢子形成的配子体分别产生的精子和卵细胞结合;(3)异交,即由不同孢子体产生的孢子形成的配子体上发育的精子和卵细胞之间的受精作用^[31-32],此外,蛇足石杉还可利用芽胞进行无性繁殖^[33]。早期的研究认为同孢型蕨类以自交为主^[34],而近期的等位酶研究则揭示了该类群植物具有从严格自交到异交的多样化生殖方式^[35]。但

对石松类而言,上述 2 种方式的自交极其罕见^[36],因此,异交可能是蛇足石杉主要的繁殖方式。

某些石松类植物的孢子在人工条件下的萌发非常困难,极少数萌发形成的配子体在培养基上也不能正常发育^[37-39],可能由于这个原因,目前对蛇足石杉和多数石松类植物有性过程的认识仍是空白。然而,有研究显示,适当扰动的生境有利于石松类植物孢子萌发和完成配子体(有性)世代生活史^[36],但无性繁殖同时也对居群的扩展及其遗传多样性具有强烈的塑造作用^[40]。例如,在郁闭山毛榉和云杉林(closed beech and spruce forests)下几无扰动的生境中,多穗石松(*Lycopodium annotinum*)居群完全凭藉水平生长的根状茎进行无性繁殖^[41],因此,居群中几乎检测不到扩增位点^[40]。本研究表明,位于黄水国家公园内的扇子坪居群,由于受到较好的保护,生境受扰动较少,其遗传多样性水平在 4 个研究居群中最低,同样受到生境保护的铁峰山居群与其类似,说明遗传多样性水平的降低可能由芽胞或分株等无性繁殖所导致;而代表极端扰动生境的坪坝营居群(采伐迹地)全部由未分叉的幼苗构成,这些幼年个体可能完全来源于孢子的萌发,因而表现出最高的遗传多样性水平。

综上所述,蛇足石杉较高水平的遗传多样性,一方面可能是遗传变异长期积累的结果,由于石松类物种形成可上溯至晚志留纪到早泥盆纪,到石炭纪发展到顶峰,广布全球^[42],因此,蛇足石杉拥有一个广泛连续分布且具丰富遗传基础的祖先,在经历多次地史变迁后,绝大多数石松植物灭绝了,而该种不仅存留至今而且依然广布,说明在其漫长的演化历史上以异交为主的有性生殖带来的基因重组、突变和祖先遗存的较高遗传多样性等因素的叠加累积效应致使其在物种水平上保持着较高的遗传多样性;另一方面,虽然近期的过度采挖和生境破坏使居群内个体数目大大减少,从而片段化为不连续分布的小居群,然而,与有花植物在相似条件下由于“小居群遗传衰退”效应导致的遗传多样性下降不同,由于其有性过程主要发生在配子体世代,成熟孢子体散发的难以计数的孢子和庞大的地下孢子库却能在适宜的条件下萌发成配子体,来自不同配子体的两性配子完成受精继而发育为幼孢子体,因此,各居群仍能保持较高水平的遗传多样性。

3.2 居群遗传结构

物种的遗传多样性及其分布格局与影响基因交流的生活史性状有关,例如繁育系统和分布范围等,

其中,由于繁育系统控制着群体内和群体间遗传多样性的分配,是决定植物居群遗传结构最主要的因素^[18]。Bussell^[43]对 35 个物种的 RAPD 数据进行总结后发现,其中 29 个远交物种居群间的变异占总遗传变异的 0.9%~41.3%,而 6 个近交物种则为 44.8%~66.9%。Hogbin 等^[44]也总结了 7 个物种的 RAPD 分析结果,发现异交物种的遗传变异主要分布在居群内,而居群间的遗传变异通常不到 27%。Morjan 等^[45]在统计分析不同植物类群的繁育系统与基因流关系后发现,异交物种居群间的平均基因流 N_m 为 1.38,而自交物种仅为 0.43。根据本研究得出的蛇足石杉居群间遗传分化参数,即基因分化指数 G_{ST} 为 0.159、基因流 N_m 为 2.647、Shannon's 居群分化系数 $[(I_{sp} - I_{pop})/I_{sp}]$ 为 0.158,以及居群间变异占总变异 24.23% 的 AMOVA 分析,可推断蛇足石杉的繁育系统类型属于异交型,再次印证了 Soltis 和 Soltis^[35-36]对石松类植物繁育系统的总结和上述根据居群遗传多样性水平推断的结论。

植物基因流的大小在很大程度上取决于繁殖体的移动方式,风媒传粉植物的基因流大于动物传粉和自花授粉植物^[46]。石松类植物每株成熟孢子体产生数以千万计的孢子,这些轻若尘埃的孢子可以藉风传播很远的距离。孢子的风媒传播大大增强了各居群间的基因交流,这种由风媒孢子产生的高强度基因流对于蕨类植物居群“均质化”的作用远远超过大多数风媒种子植物^[35]。

越来越多的证据证明,基因流强弱对群体的遗传分化具有重要影响^[47],如果说自然选择是导致居群分化最主要的力量,那么基因流则是对抗自然选择的重要因素^[48]。Slatkin^[49]认为,当基因流小于 1 时,就不足以抵制居群内因遗传漂变而引起的居群间遗传分化。个体 UPGMA 聚类结果显示,100 个个体并未按各自的居群聚类,居群间的个体都有交迭, AFLP 分析蛇足石杉居群间基因流 N_m 为 2.647,表明居群间存在较大的基因流,足以防止由于遗传漂变而引起的居群间遗传分化。

Harmrick 等^[18]认为,居群的地理分布和遗传多样性分布没有直接的相关性。经 Mantel 检验,本研究表明蛇足石杉的遗传距离和地理距离间同样没有显著的相关性($r=0.269$, $P=0.887$)。从居群位置和 UPGMA 居群聚类可看出,扇子坪与铁峰山居

群之间地理距离最近,但遗传距离反而最远,因此,居群间地理距离与遗传距离并无显著的相关性,地理隔离对蛇足石杉居群遗传分化没有显著影响。

3.3 致危因素和保护措施

以上研究结果表明,蛇足石杉目前的濒危现状并非由于其遗传多样性丧失造成的。根据近 5 年对蛇足石杉资源及收购情况的实地跟踪调查,由于毁林修路、开荒、伐木等人类活动造成生境破坏和片段化,以及对野生植株地毯式的采挖,致使居群自然更新过程受阻,这些可能是造成蛇足石杉濒危的主要原因。加之蕨类植物在群落中的竞争力较弱、生活史过程复杂而且漫长,一经破坏便很难恢复^[50-51]等自身生物学特性,如不采取有效的保护措施,极有可能使其濒危程度进一步加剧。

参考其它濒危物种保护遗传学的研究成果^[44,52],结合蛇足石杉的分布、生物学特性和生存现状,我们提出以下保护建议:(1)针对蛇足石杉遗传多样性水平较高,但居群和个体数量都在急剧下降的现状,应立即对现存居群实施及时有效的就地保护,严禁地毯式采挖;(2)由于蛇足石杉孢子体生长发育具有较严苛的“小生境”选择特性,例如,全由孢子萌发小苗建立起来的坪坝营居群,虽然个体数量不少,遗传多样性也最高,但其生境(无遮蔽的采伐迹地)并不符合该种生长发育所需的“小生境”条件,这些幼年个体很难成活,居群不久便会消亡。因此,保护其适生生境不被进一步破坏,或在更大尺度上加强对相应森林群落的保护,以形成更多适宜蛇足石杉生长发育的“小生境”,从而促使居群的自然恢复更新;(3)加强对蛇足石杉保护的宣传力度,制定科学合理的间采规范,使生境得到适当的扰动,以促使更多的孢子萌发。同时,鼓励当地农民采取野生抚育,集中移栽管理等各种措施建立半人工居群,使当地群众在保护的同时进行开发并能从中获益;(4)积极开展和推进引种驯化研究,在适宜地区开展人工栽培,使其在开发应用中得到保护。

本研究旨在为蛇足石杉的保护生物学研究提供遗传变异水平及遗传结构等遗传学背景信息,但一个物种的濒危是多种内外因素共同作用的结果。因此,尚需进一步对蛇足石杉的进化历史、世代交替的生活史过程、繁育系统等问题进行深入研究,以全面认识其物种特性,准确揭示其濒危机制,从而制定出科学合理的保护对策和行之有效的保护措施。

参考文献:

- [1] 张宪春,张丽兵. 中国植物志(第6卷第3分册)[M]. 北京:科学出版社,2004:1—31.
- [2] WU H(吴 荭),ZHUANG P(庄 平),FENG ZH B(冯正波),*et al.* Resource investigation and assessment of *Huperzia serrata* [J]. *Journal of Natural Resources* (自然资源学报),2005,**20**(1):59—67(in Chinese).
- [3] MA X Q,TAN C H,ZHU D Y,*et al.* Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of Huperziaceae species in China[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2005,**53**(5):1 393—1 398.
- [4] MA X Q,TAN C H,ZHU D Y,*et al.* A survey of potential huperzine A natural resources in China:the Huperziaceae[J]. *Journal of Ethnopharmacology*,2006,**104**(1—2):54—67.
- [5] MA X Q,GANG D R. The Lycopodium alkaloids[J]. *Natural Product Reports*,2004,**21**(6):752—772.
- [6] ZHANG L B(张丽兵),KUNG H S(孔宪需). Taxonomy of the genus *Huperzia* Bernh. (sen. Str.) sect. *Serratae* (Rothm.) Holub in China[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报),2000,**38**(1):13—22(in Chinese).
- [7] 应俊生,张玉龙. 中国种子植物特有属[M]. 北京:科学出版社,1994:6—15,608—629.
- [8] CHEN G X(陈功锡),LIAO W B(廖文波),AO CH Q(敖成齐),*et al.* Studies on character and feature of seed plants flora of Wulingshan region[J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究),2001,**21**(4):527—535(in Chinese).
- [9] VOS P,HOGERS R,BLEEKER M,*et al.* AFLP:a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*,1995,**23**(21):4 407—4 414.
- [10] JUAN A,CRESPO M B,COWAN R S,*et al.* Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean,as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) [J]. *Molecular Ecology*,2004,**13**(9):2 679—2 690.
- [11] KANG M,YE Q G,HUANG H W. Genetic consequence of restricted habitat and population decline in endangered *Isoetes sinensis* (Isoetaceae) [J]. *Annals of Botany*,2005,**96**(7):1 265—1 274.
- [12] DOYLE J J,DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*,1987,19:11—15.
- [13] TIXIER M H,SOURDILLE R M,LEROY P,*et al.* Detection of wheat microsatellites using a non radioactive silver-nitrate staining method[J]. *Journal of Genetic Breeding*,1997,51:175—177.
- [14] ZHANG F M(张富民),GE S(葛 颂). Data analysis in population genetics. I. Analysis of RAPD data with AMOVA[J]. *Biodiversity Science* (生物多样性),2002,**10**(4):438—444(in Chinese).
- [15] NEI M,LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences,USA*,1979,76:5 269—5 273.
- [16] ERIKSSON G,NAMKOONG G,ROBERT J. Dynamic conservation of forest tree gene resources[J]. *Forest Genetic Resources*,1995,23:2—5.
- [17] KNAEPKENS G,BERVOETS L,EENS M. Relationship between population size and genetic diversity in endangered populations of the European bullhead (*Cottus gobio*): implications for conservation[J]. *Biological Conservation*,2004,**115**(3):403—410.
- [18] HAMRICK J L,GODT M J W. Allozyme diversity in plant species[M]//BROWN A H D,CLEGG M T,KAHLER A L,WEIR B S. *Plant Population Genetics,Breeding and Genetic Resources*. Sunderland:Sinauer,1990:43—63.
- [19] FALK D A,HOLSINGER K E. Genetics and Conservation of Rare Plants[M]. New York:Oxford University Press, .
- [20] LI A(李 昂),GE S(葛 颂). Advances in plant conservation genetics[J]. *Biodiversity Science* (生物多样性),2002,**10**(1):61—71(in Chinese).
- [21] CHEN J M(陈进明),WANG J Y(王晶苑),LIU X(刘 星),*et al.* RAPD analysis for genetic diversity of *Isoetes sinensis* [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性),2004,**12**(3):348—353(in Chinese).
- [22] CHEN J M,WANG J Y,LIU X,*et al.* RAPD analysis for genetic variation within the endangered quillwort *Isoetes hypsophila* (Isoetaceae) [J]. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*,2005,**10**(2):455—459.
- [23] CHEN J M,LIU X,WANG J Y,*et al.* Genetic variation within the endangered quillwort *Isoetes hypsophila* (Isoetaceae) in China as evidenced by ISSR analysis[J]. *Aquatic Botany*,2005,82:89—98.
- [24] MIKI M,ASADA Y J. High genetic variability revealed by allozymes loci in the narrow endemic fern *Polystichum otomasui* (Dryopteridaceae) [J]. *Heredity*,1998,80:604—610.
- [25] KINGSTON N,WALDREN S,SMYTH N. Conservation genetics and ecology of *Angiopteris chauliodonta* Copel. (Marattiaceae),a critically endangered fern from Pitcairn Island,South Central Pacific Ocean[J]. *Biological Conservation*,2004,117:309—319.

- [26] DONG Y H, CHEN J M, GITURU R W, *et al.* Gene flow in populations of the endangered aquatic fern *Ceratopteris pteridoides* in China as revealed by ISSR markers[J]. *Aquatic Botany*, 2007, 87: 69—74.
- [27] DONG Y H, CHEN J M, WAHITI ROBERT G, *et al.* Genetic variation in the endangered aquatic fern *Ceratopteris thalictroides* (Parke-riaceae) in China: implications from RAPD and ISSR data[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2008, 157: 657—671.
- [28] HAMRICK J L, GODT M J W. Conservation genetics of endemic plant species[M]//AVISE J C, HAMRICK J L. Conservation genetics: Case histories from nature. Melbourne: Chapman and Hall, 1996: 281—304.
- [29] SOLTIS D E, SOLTIS P S. The distribution of selfing rates in homosporous ferns[J]. *American Journal of Botany*, 1992, 79: 97—100.
- [30] KLEKOWSKI E J. The genetic and reproductive biology of ferns[M]//DYER A F. The experimental biology of ferns. London: Academic Press, 1979: 133—170.
- [31] BANKS J A. Gametophyte development in ferns[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 163—186.
- [32] PRYOR K V, YOUNG J E, RUMSEY F J, *et al.* Diversity, genetic structure and evidence of outcrossing in British populations of the rock fern *Adiantum capillus-veneris* using microsatellites[J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10(8): 1 881—1 894.
- [33] WANG X L(王小明), LI W K(黎万奎), ZHOU J Y(周吉燕), *et al.* Morphological study on gemmae and gemmalings of *Huperzia ja-vanica* (Huperziaceae)[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2007, 29(5): 521—526(in Chinese).
- [34] KLEKOWSKI E J, BAKER H G. Evolutionary significance of polyploidy in the pteridophyta[J]. *Science*, 1966, 153(3 733): 305—307.
- [35] SOLTIS D E, SOLTIS P S. Genetic variation within and among populations of ferns[J]. *American Fern Journal*, 1990, 80: 161—172.
- [36] SOLTIS P S, SOLTIS D E. Estimated rates of intragametophytic selfing in lycopods[J]. *American Journal of Botany*, 1988, 75: 248—256.
- [37] BRUCHMANN H. Die keimung der sporen und die entwicklung der prothallien von *Lycopodium clavatum* L., *L. annotinum* L. und *L. selago* L. [J]. *Flora*, 1910, 101: 220—267.
- [38] BRUCE J G. Gametophytes and subgeneric concepts in *Lycopodium*[J]. *American Journal of Botany*, 1976, 63: 919—924.
- [39] WHITTIER D P, STORCHOVA H. The Gametophyte of *Huperzia selago* in culture[J]. *American Fern Journal*, 2007, 97: 149—154.
- [40] WITTIG R, JUNG MANN R, BALLACH H J. The extent of clonality in large stands of *Lycopodium annotinum* L. [J]. *Flora*, 2007, 202(2): 98—105.
- [41] WITTIG R, HUCK S, WITTIG M. Verbreitung, vergesellschaftung und ökologie der Bärlappe (Lycopodiaceae) im Zentrum des Roth-aargebirges[J]. *Abhandlungen aus dem Westfälischen Museum für Naturkunde*, 1999, 61: 39—75.
- [42] KRAMER K U, GREEN P S. The families and genera of vascular plants[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1990.
- [43] BUSSELL J D. The distribution of random amplified polymorphic DNA(RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobe-iaceae)[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 775—789.
- [44] HOGGIN P M, PEAKALL R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria pros-trate*[J]. *Conservation Biology*, 1999, 13: 514—522.
- [45] MORJAN C L, RIESEBERG L H. How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles[J]. *Molecular Ecology*, 2004, 13(6): 1 341—1 356.
- [46] WEN Y F(文亚峰), HAN W J(韩文军), WU SH(吴 顺). Plant genetic diversity and its influencing factors[J]. *Journal of Central South Forestry University* (中南林业科技大学学报), 2010, 30(12): 80—87(in Chinese).
- [47] HARTL D L, CLARK A G. Principle of Population Genetics(2nd edition)[M]. Sunderland: Sinauer, 1989.
- [48] 陈家宽, 杨 继. 植物进化生物学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994: 153—208.
- [49] SLATKIN M. Gene flow in natural populations[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1985, 16: 393—430.
- [50] GRIME J P. Factors limiting the contribution of Pteridophytes to a local flora[J]. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Sec-tion B*, 1985, 86B: 403—421.
- [51] MILTON S J. Effects of harvesting on four species of forest ferns in South Africa[J]. *Biological Conservation*, 1987, 41: 133—146.
- [52] LI Q M, XU Z F, HE T H. *Ex situ* conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China[J]. *Biological Conser-vation*, 2002, 106: 151—156.