

## 水杉栽培居群的遗传多样性研究\*

史全芬, 杨佳, 李晓东, 李新伟, 李建强\*\*

(中国科学院武汉植物园, 湖北武汉 430074)

**摘要:** 利用 RAPD 技术, 对 9 个水杉 (*Metasequoia glyptostroboides*) 栽培居群的遗传多样性进行了初步研究。用 10 bp 的随机引物 16 条, 共扩增出 103 个位点, 其中 37 个为多态位点, 占 35.92%。各居群的多态位点百分率在 16.50% ~ 33.01% 之间。POPGENE version 1.31 软件处理结果如下: 居群的 Shannon's 信息指数为 0.1930。遗传距离在 0.0130 ~ 0.0650 之间, 遗传一致度在 0.9370 ~ 0.9871 之间。AMOVA 分析结果显示遗传变异主要存在于居群内, 占 89.05%, 居群之间有一定的分化。上述结果表明水杉栽培居群的遗传多样性略低于自然居群, 涵盖了自然居群近 80% 的遗传多样性。由此可以确认栽培水杉的种源是经过混合的, 它们在相当程度上代表了自然居群的遗传多样性水平。采自潜江的 9 株丛枝水杉 (*Metasequoia glyptostroboides* var. *caespitosa*) 没有扩增出特有位点, 将其视为一个居群根据遗传一致度作 UPGMA 聚类分析时, 该居群和湖北的 3 个居群及南京 (NJ) 成都 (CD) 居群聚在一起; 单株聚类时丛枝水杉也没有聚成独立的一支, 而是比较分散, 因此不支持将丛枝水杉作为水杉的一个变种的分类处理。从亲缘关系上看, 丛枝水杉应当归属于湖北潜江蚌湖种子园 (BH) 和湖北潜江广华 (GH) 居群, 这与其分布现状也是吻合的。

**关键词:** 水杉; 丛枝水杉; 栽培居群; 遗传多样性; RAPD 分析

中图分类号: Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2005)04-0403-10

## Genetic Diversity of Cultivated Populations of *Metasequoia glyptostroboides*

SHI Quan-Fen, YANG Jia, LI Xiao-Dong, LI Xin-Wei, LI Jian-Qiang

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

**Abstract:** Random amplified polymorphic DNA markers were used for initial evaluation of genetic diversity within and among nine cultivated populations of *Metasequoia glyptostroboides*. The sixteen primers (10 bp) produced 103 loci, of which 37 (35.92%) were polymorphic. Percentage of polymorphic loci per population varied between 16.50% and 33.01%. As analyzed by POPGENE version 1.31, the data from the cultivated populations had Shannon's information index of 0.1930. The genetic distance varied between 0.0130 and 0.0650. The genetic identity varied between 0.9370 and 0.9871. AMOVA analysis indicated that 89.05% of total variation was due to difference within the populations, which showed that there was a little differentiation

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (G2000046806) 中国科学院方向性项目 (KSCX2-SW-104) 和中国科学院武汉植物园创新工程基金的资助项目 (05035123)

\*\* 通信作者: Author for correspondence. E-mail: jianqiang@hotmail.com

收稿日期: 2004-12-31, 2005-03-29 接受发表

作者简介: 史全芬 (1978-) 女, 硕士研究生, 主要从事生物多样性研究。

among populations. The genetic diversity of cultivated populations was slightly lower than that of natural populations, covering nearly 80% of the genetic diversity of natural populations of *Metasequoia glyptostroboides*. So it was true that the original seeds of cultivated populations of *Metasequoia glyptostroboides* were mixture from different individuals and populations in its original distributed regions. To some extent, it represented the genetic diversity level of the natural populations. No individual-specific loci were found in nine individuals of *Metasequoia glyptostroboides* var. *caespitosa* from Qianjiang of Hubei Province. UPGMA dendrogram of ten populations based on genetic distance showed that the population of *Metasequoia glyptostroboides* var. *caespitosa* clustered with populations of Hubei, Nanjing (NJ) and Chengdu (CD). UPGMA dendrogram of 90 individuals based on Nei's genetic identity showed that the nine individuals of *Metasequoia glyptostroboides* var. *caespitosa* were not clustered together, which did not support the taxonomical treatment that *Metasequoia glyptostroboides* var. *caespitosa* was a variety of *Metasequoia glyptostroboides*. In respect to genetic relationship, *Metasequoia glyptostroboides* var. *caespitosa* belongs to the populations from Banghu Seeds Garden (BH) and Guanghua (GH), Qianjiang City, Hubei Province, which is consistent with their current distribution pattern.

**Key words:** *Metasequoia glyptostroboides*; *Metasequoia glyptostroboides* var. *caespitosa*; Cultivated populations; Genetic diversity; RAPD

水杉 (*Metasequoia glyptostroboides*) 是我国特有的“活化石”植物, 隶属于杉科 (Taxodiaceae), 水杉属 (*Metasequoia*)。水杉的发现是 20 世纪植物学界的一件大事。1941 年日本学者根据化石建立了水杉属 (Miki, 1941), 同时认定这类化石植物在地球上已经不复存在。1948 年我国植物学家发表了活化石植物水杉, 引起植物学界的巨大轰动 (Hu and Cheng, 1948; Hu, 1948)。水杉起源于第三纪前, 在第三纪有着广域分布 (胡先, 1954; 于永福, 1995), 但现今仅自然子遗分布于湖北、湖南和重庆 (原四川省东部) 三省市交界的狭窄区域 (Hu, 1948; Chaney, 1948; Hu, 1980; 李作洲等, 2003; 李晓东等, 2003)。自从 1948 年水杉的种子首次被邮寄到美国波士顿 (Merrill, 1948), 经过 50 多年人工繁殖和引种, 水杉现已遍及我国 25 个省、市、区和世界 50 多个国家和地区, 并显示出极强的适应性 (林协, 1976; 王希群等, 2004; Satoh, 1999; Kuser, 1999)。由于人类的迁地保育, 水杉目前已经超出了其原来的分布区范围, 这是否表明人类已经成功地完成了对水杉的保护? 要回答这个问题就有必要对这些栽培水杉的遗传多样性进行研究, 看其是否涵盖了其自然子遗居群的遗传多样性, 其进化潜力到底如何? 另外, 由于偏重某些性状特征, 人工栽培会不会引起栽培居群的遗传多样性降低 (Miller and Tanksley, 1990; Wilde 等, 1992)?

植物的成功保育, 在于保育物种的基因库, 保育其最大的遗传多样性, 以提供物种应对环境变迁的持续进化潜力 (Eriksson 等, 1995)。自水杉被发现以来, 植物学家已经对水杉作了大量的研究和保护繁育工作, 早期的研究大都集中在其分类学、生态学、形态学、细胞学和胚胎发育等方面 (Hu, 1948; Stebbins, 1948; 郑万钧和曲仲湘, 1949; Chu and Cooper, 1950; 斯行健, 1951; 王伏雄和钱南芬, 1964; Fulling, 1976; Bartholomew 等, 1983; 李林初, 1986; 李建华和班继德, 1989)。随着分子生物学和计算机科学的发展, 分子标记技术被越来越广泛地应用于濒危生物的遗传多样性研究中, 已经有一些关于水杉遗传多样性的报道 (张文英和李明鹤, 1994; Kuser 等, 1997; 李春香等, 1999; 李晓东等, 2003; 李作洲等, 2003; Chen 等, 2003), 但这些研究主要是针对水杉的子遗自然居

群，有的只包括了少量的栽培样本；Kuser 等（1997）只分析了两个迁地保护居群，对中国大面积水杉栽培居群的遗传多样性的系统研究还未见报道。

此外，水杉的变种丛枝水杉（*Metasequoia glyptostroboides* var. *caespitosa*）已经发表 20 年（龙耀华和吴越，1984），尽管中国植物志英文版已经对该变种作了归并处理（Fu 等，1999），但其分类地位仍然存在疑问。

本研究利用 RAPD 技术，对水杉 9 个栽培居群和一个美国样本共 149 个样本进行遗传多样性分析，目的在于：1）采用 RAPD 分子标记方法来揭示水杉栽培居群的遗传多样性水平，为水杉的进一步引种栽培和保护提供科学依据；2）利用 RAPD 资料为归并丛枝水杉提供佐证。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验材料采集于 2003 年 3~4 月，水杉的 9 个居群和样本数分别为：湖北潜江蚌湖种子园（BH）14 株（含 5 株丛枝水杉）；湖北潜江广华（GH）14 株（含 4 株丛枝水杉）；湖北潜江林科所（LKS）32 株；南京（NJ）17 株；北京（BJ）9 株；上海（SH）8 株；昆明（KM）9 株；武汉（WH）37 株；成都（CD）8 株；外加美国（USA）1 株。取幼嫩的水杉叶片，用硅胶干燥后保存用于提取 DNA。

### 1.2 水杉基因组 DNA 的提取和检测

取硅胶干燥的幼嫩的新鲜叶片材料，加入液氮研磨后，按 Rogers and 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。样品 DNA 用 0.1 x TE 溶解后用紫外分光光度计（Eppendorf Biophotometer Germany）和 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳（BioRAD 电泳仪上进行）检测其质量。结果显示：用于扩增的 149 个样品 DNA 的 OD<sub>260/280</sub> 值均在 1.60~1.90 之间；电泳图谱亦显示各样品 DNA 质量较好。

### 1.3 引物的选用

采用前人筛选出的 16 条引物用于全部水杉 DNA 样品的扩增（李晓东等，2003），引物的编号分别为：OPA07、OPB04、OPB06、OPB10、OPB15、OPF02、OPF03、OPF05、OPG03、OPG06、OPG09、OPG13、OPG16、OPG18、OPK12、OPT20，引物的序列如表 1。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

表 1 各条引物序列、扩增位点、多态位点、多态位点百分率与扩增片段大小情况

Table 1 Primers, sequences, amplification loci, polymorphic loci, percentage of polymorphic loci and length of fragments

引物 Primers	序列（5'~3'） Sequences	总位点数 Total loci	多态位点数 Polymorphic loci	多态位点百分率 PPL（%）	片段大小 Length of fragments（bp）
OPA07	GAAACGGGTG	8	4	50.00	495-1700
OPB04	GGA CTGGAGT	5	3	60.00	630-1600
OPB06	TGCTCTGCC	2	0	0.00	970-1060
OPB10	CTGCTGGGAC	9	9	100.00	700-2200
OPB15	GGAGGCTGTT	7	4	57.14	580-1900
OPF02	GAGGATCCCT	3	0	0.00	550-1144
OPF03	CCTGATCAC	9	5	55.56	800-2140
OPF05	CCGAATTCCC	8	0	0.00	680-1900
OPG03	GAGCCCTCCA	4	0	0.00	750-1750
OPG06	GTGCCTAACC	8	0	0.00	720-2100
OPG09	CTGACGTCAC	8	4	50.00	580-2300
OPG13	CTCTCCGCCA	7	3	42.86	450-2400
OPG16	AGCGTCTCC	9	4	44.44	575-2400
OPG18	GGTCCATGTG	6	1	16.67	580-1380
OPK12	TGGCCCTCAC	4	0	0.00	990-1350
OPT20	GACCAATGCC	6	0	0.00	620-2500

### 1.4 PCR 扩增及产物检测

用 16 条 10 bp 的引物对全部的 DNA 样品进行 PCR 扩增。基因组 DNA 根据所测浓度稀释至 10 ng/ $\mu$ l 作为模板。反应总体积为 25  $\mu$ l, 其中 10 x PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, 2 mmol/L dNTPs Mix 2.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5  $\mu$ l, Taq DNA Polymerase (5  $\mu$ l/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, Primer (15 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 模板 DNA (10 ng/ $\mu$ l) 3  $\mu$ l, 灭菌双蒸水 13.3  $\mu$ l。本反应体系中除引物外, 其余试剂均为 MBI Fermentas 公司产品。扩增反应在 Eppendorf AG 仪上进行。每次设一阴性对照 (使用同体积的灭菌双蒸水代替体系中的 DNA 模板) 检测是否存在污染。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 接 40 个循环, 每个循环 94 $^{\circ}$ C 30 s, 35 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 再接 72 $^{\circ}$ C 5 min, 然后反应终止在 4 $^{\circ}$ C。

扩增产物检测: 扩增产物采用 2% 琼脂糖 (Spain) 凝胶电泳, 以 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (分子量 100 ~ 3 000 bp, MBI Fermentas 公司产品) 作为相对分子量标准。电泳缓冲液为 1 x TBE, 在 Bio-RAD 电泳仪上进行, 3 V/cm (120 V) 恒定电压下电泳 3 h, EB (1  $\mu$ g/ml) 染色 1 h, 双蒸水中脱色 1 h, 用 Alpha Innotech 照相, 并及时在照片上标明引物号、样品编号以及日期, 妥善保存。

### 1.5 数据分析

为了保证结果的稳定性, 每次扩增重复 2 ~ 3 次, 清晰、重复性良好的带用于最终的数据分析。根据 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 指示的标准分子量, 对照反应产物在琼脂糖凝胶上的位置, 估计扩增产物的分子量的大小, 依据统一的标准, 有带的记为 1, 无带的记为 0, 生成 0/1 矩阵图。用 POPGEN version 1.31 软件 (Francis and Yang, 1999) 计算多态位点百分率、Shannon's 信息指数以及遗传一致度和遗传距离。利用 RAPD 数据和 AMOVA-PREP (Miller, 1998) 进行居群的分子方差分析 (Analysis of Molecular Variance AMOVA, Excoffier 等, 1992)。用 NTSYSpc version 2.1 (Rohlf, 2000) 做居群和单株的聚类分析。

由于美国的样本只有一个, 数目太少, 故在做居群分析时未将其列入。

表 2 水杉 9 个栽培居群的遗传变异

Table 2 Genetic variation of nine cultivated populations of *Metasequoia glyptostroboides*

居群 Population	个体数 No. of Samples	多态位点数 No. of Polymorphic loci	多态位点 百分率 PPL (%)	Shannon's- 指数 I
BH	14	24	23.30	0.1397
GH	14	28	27.18	0.1621
LKS	32	33	32.04	0.1834
NJ	17	29	28.16	0.1729
BJ	9	21	20.39	0.1169
SH	8	17	16.50	0.0927
KM	9	18	17.48	0.1082
WH	37	34	33.01	0.1807
CH	8	24	23.30	0.1401
Total	148	37	35.92	0.1930

\* I = Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

## 2 结果与分析

### 2.1 栽培水杉的 RAPD 遗传多样性

用 16 条 10 bp 的引物对水杉的 9 个栽培居群和美国的 1 个样本共 149 个样本进行 RAPD 扩增, 共得到稳定的带 103 条, 其中多态性的带 37 条, 多态位点百分率为 35.92%。不同引物扩增的片段数目不等, 其中 OPB10 扩增得到的片段最多, 为 10 条, OPB06 最少, 为 2 条, 平均为 6.4 条。Shannon's 信息指数 I = 0.1930。居群的多态位点百分率在 16.50% ~ 33.01% 之间, 多态位点百分率最高的是武汉

(WH) 居群 (33.01%), 最低的是上海 (SH) 居群 (16.50%)。Shannon's 信息指数在 0.1834 ~ 0.0927 之间。值得一提的是, 武汉 (WH) 居群的多态位点百分率最高 (33.01%), 但它的 Shannon's 信息指数略低于潜江林科所 (LKS) 居群。除去这两个居群, 其他居群的 Shannon's 信息指数的大小与各居群多态位点百分率的大小趋势一致。南京 (NJ) 和潜江蚌湖种子园 (BH) 居群的多态位点百分率一样, 都为 23.30%, 但都是南京 (NJ) 的 Shannon's 信息指数稍微高一些。

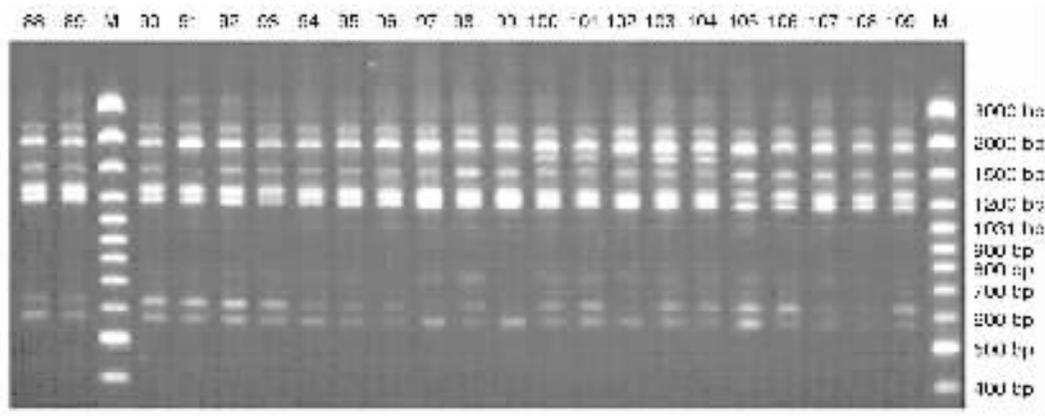


图1 引物 OPG09 对北京 (88~96) 昆明 (97~105) 武汉 (106~109) 居群样品的 RAPD 扩增谱带

Fig. 1 RAPD bands of *Metasequoia glyptostroboides* BJ (88-96), KM (97-105), WH (106-109) populations amplified with primer OPG09. M was the marker labeling the length of the fragments (ladder: 400-3000 bp).

## 2.2 栽培水杉的居群的遗传变异

AMOVA 分析结果显示, 在总的遗传变异中有 10.95% 的变异发生在居群间, 有 89.05% 的变异发生在居群内, 居群间和居群内变异均极显著 ( $P < 0.001$ ) (表 3)。居群遗传分化分析表明, 水杉栽培居群间已经具有一定程度的遗传分化。

表 3 水杉栽培居群内和居群间分子变异的 AMOVA 分析结果

Table 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) within/among *Metasequoia glyptostroboides* populations

变异来源 Source variation	自由度 d.f.	平方和 SSD	平均平方值 MSD	方差 Variance component	占总方差百分比 Percentage of total variance (%)	P 值 P-Value
Among populations	8	108.8814	13.610	0.5721	10.95	< 0.001
Within population	139	646.6862	4.652	4.6524	89.05	< 0.001
Total	147	755.5676				

d.f.: degree of freedom; SSD: Sum of squares; MSD: Mean squares. The  $P$  value was estimated by composing 9999 permutations

## 2.3 遗传距离与遗传一致度

Nei's 遗传一致度 ( $I$ ) 和遗传距离 ( $D$ ) 反映了居群之间的遗传分化程度 (Nei, 1978)。水杉栽培居群间遗传一致度 ( $I$ ) 和遗传距离 ( $D$ ) 见表 4。由表 4 可知,  $I$  值的变化范围在 0.9370~0.9871 之间,  $D$  值的变化范围在 0.0130~0.0650 之间, 潜江广华水杉园 (GH) 与潜江林科所 (LKS) 居群之间的  $I$  值最大 (0.9871), 潜江蚌湖种子园 (BH) 与上海 (SH) 居群之间的  $I$  值最小 (0.9370)。其中, 昆明 (KM) 和北京 (BJ) 居群之间的遗传距离与武汉 (WH) 和上海 (SH) 居群之间的遗传距离同为 0.0461, 相应的遗传一致度分别为 0.9549 和 0.9550, 相差 0.0001; 潜江广华水杉园 (GH) 和上海 (SH) 居群之间的遗传一致度与昆明 (KM) 与上海 (SH) 居群的遗传一致度同为 0.9449, 相应的遗传距离分别为 0.0566 和 0.0567, 相差也仅为 0.0001。此分析结果表明: 9 个栽培水杉居群的遗传一致度较高, 说明栽培水杉居群之间具有较大的遗传相似性, 但也有一定的遗传分化。

## 2.4 聚类分析

表 4 Nei's 遗传一致度 ( $I$ ) (右上角) 和遗传距离 ( $D$ ) (左下角)Table 4 Nei's genetic identity ( $I$ ) (above diagonal) and genetic distance ( $D$ ) (below diagonal)

Pop.	BH	GH	LKS	NJ	BJ	SH	KM	WH	CD
BH	****	0.9766	0.9767	0.9694	0.9541	0.9370	0.9641	0.9765	0.9675
GH	0.0237	****	0.9871	0.9788	0.9524	0.9449	0.9618	0.9835	0.9830
LKS	0.0236	0.0130	****	0.9868	0.9575	0.9588	0.9721	0.9869	0.9847
NJ	0.0311	0.0215	0.0133	****	0.9579	0.9596	0.9572	0.9824	0.9744
BJ	0.0470	0.0488	0.0434	0.0430	****	0.9510	0.9549	0.9611	0.9378
SH	0.0650	0.0566	0.0420	0.0413	0.0502	****	0.9449	0.9550	0.9518
KM	0.0366	0.0390	0.0283	0.0437	0.0461	0.0567	****	0.9628	0.9494
WH	0.0238	0.0166	0.0131	0.0177	0.0397	0.0461	0.0379	****	0.9763
CD	0.0331	0.0171	0.0154	0.0259	0.0643	0.0494	0.0519	0.0240	****

2.4.1 居群聚类 按照采集地点划分的 9 个居群的聚类结果 (图 2) 显示: 整个湖北地区、南京 (NJ) 和成都 (CD) 聚为一大支。湖北广华 (GH) 居群和湖北林科所 (LKS) 居群优先聚类, 其次是湖北武汉 (WH) 居群, 再次是南京 (NJ) 和成都 (CD), 而潜江蚌湖种子园 (BH) 虽然同广华 (GH) 和林科所 (LKS) 居群同域, 却聚在南京 (NJ) 和成都 (CD) 之后, 说明南京 (NJ) 和成都 (CD) 居群在来源上更接近广华 (GH) 和林科所 (LKS) 居群。

将 9 个丛枝水杉样本作为一个居群 (CZ), 再进行聚类分析, 结果如图 3。

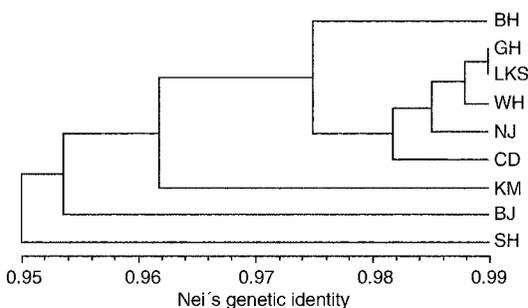


图 2 栽培水杉居群间 Nei's 遗传一致度的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram for nine populations of *Metasequoia glyptostroboides* based on Nei's genetic identity

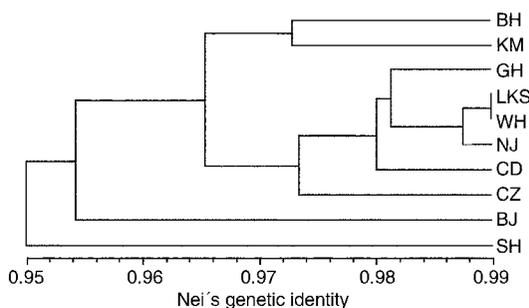


图 3 栽培水杉居群间 Nei's 遗传一致度的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for ten populations of *Metasequoia glyptostroboides* based on Nei's genetic identity

整个居群的聚类关系和没有将丛枝水杉单列为一居群的结果非常相似, 整个湖北居群和南京 (NJ) 成都 (CD) 居群仍然聚为一大支, 丛枝水杉并没有聚得最远。AMOVA 结果显示, 居群内的变异为 89.28%, 和前述的 89.05% 非常接近。

2.4.2 单株聚类 把丛枝水杉作为一个居群, 从每个居群取 8~10 个样进行遗传距离的聚类分析。单株聚类结果 (图 4) 表明: 没有一个居群的样本是全部聚在一起的, 而是聚得比较混杂。丛枝水杉的 9 个样本分别来自湖北潜江蚌湖种子园 (BH) 和湖北潜江广华 (GH) 居群, 单株聚类结果显示出它们之间的近缘关系。例如丛枝水杉个体 (82) 与湖北潜江蚌湖种子园 (BH) 的个体 (3, 6) 聚在一起; 丛枝水杉个体 (83, 84) 与湖北潜江蚌湖种子园 (BH) 的个体 (5) 聚在一起; 丛枝水杉个体 (85, 86) 与湖北潜江蚌湖种子园 (BH) 的个体 (7, 8) 聚在一起, 然后再与丛枝水杉个体 (89, 90) 聚在一起; 丛枝水杉个体 (87) 与湖北潜江广华 (GH) 的个体 (18) 聚在一起。

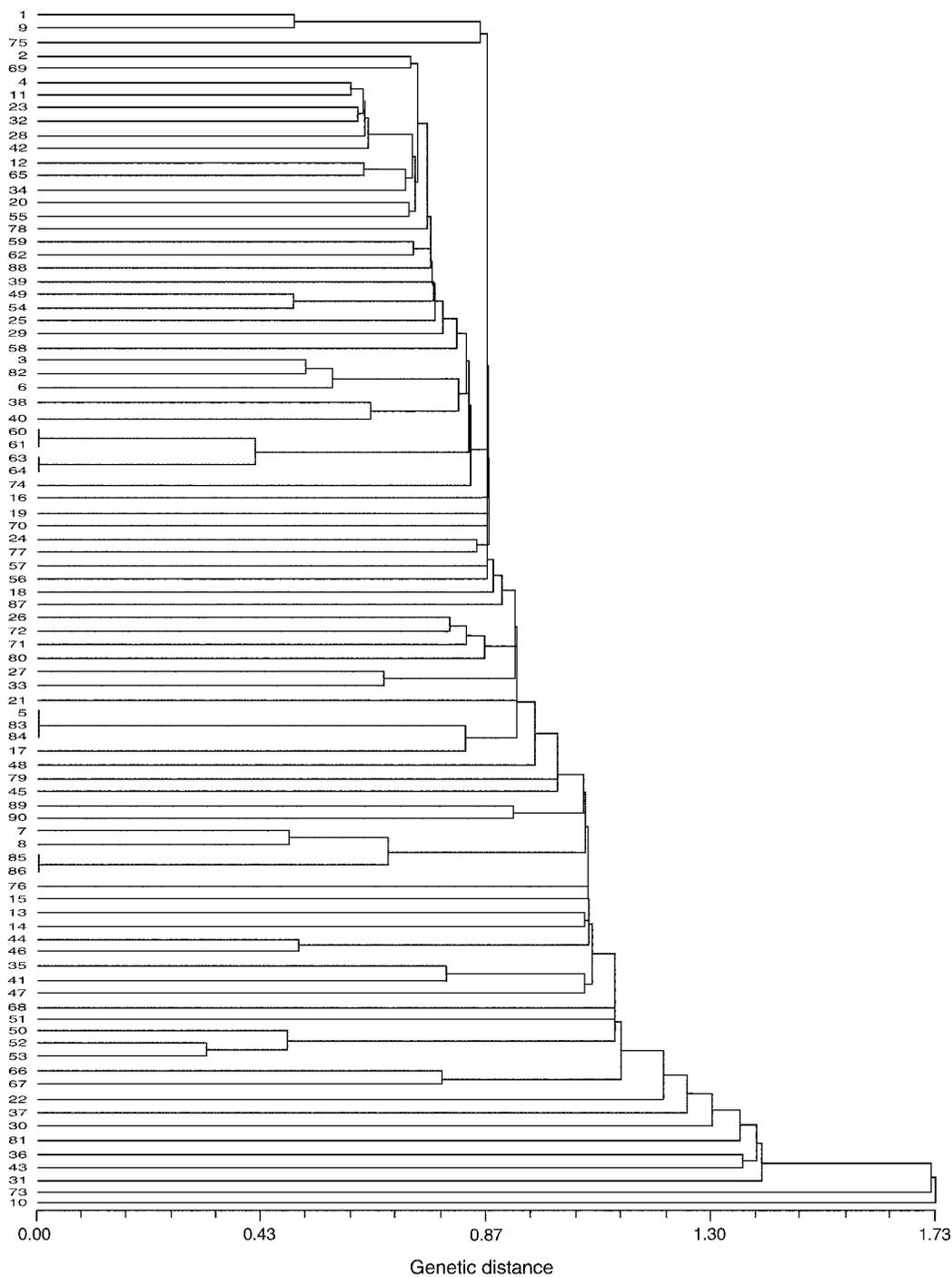


图4 栽培水杉遗传距离的UPGMA聚类图

Fig. 4 UPGMA dendrogram for 90 individuals of *Metasequoia glyptostroboides* based on genetic distance  
BH : 1-9 ; GH : 10-19 ; LKS : 20-28 ; NJ : 29-37 ; USA : 38 ; BJ : 39-47 ; SH : 48-55 ; KM : 56-64 ;  
WH : 65-73 ; CD : 74-81 ; CZ : 82-90

### 3 分析与讨论

#### 3.1 栽培水杉的遗传多样性和保护

遗传多样性是生物多样性的核心,保护生物多样性最终是要保护其遗传多样性,因为一个物种的稳定性和进化潜力依赖其遗传多样性,而物种的经济和生态价值也依赖其特有的基因组成(王洪新和胡志昂,1996)。水杉已经有 50 多年的栽培历史,其现在的分布区域已经超出其天然的分布范围,这是由于人类的干预,一个濒临绝灭的植物物种迅速恢复和扩大其分布区域的成功案例。由于缺少对于水杉栽培居群遗传多样性水平的分子证据,还不能作出人类已经成功地完成了水杉的迁地保育的结论。本实验结果显示栽培水杉居群总的多态位点百分率(PPL)为 35.92,略低于自然居群的 PPL 值 38.6(李晓东等,2003)。这与我们最近完成的水杉自然居群与栽培居群在等位酶水平揭示出的总的多态位点百分率的值非常接近,前者的 PPL 值为 38.69,后者为 33.15(李晓东等,2005)。上述研究结果表明水杉栽培居群的遗传多样性水平与自然居群较为接近,平均相差约 4 个百分点,覆盖了 80% 水杉自然居群的遗传多样性水平。单株聚类结果显示各个居群的样本聚得比较混杂。由此,可以确认栽培水杉的种源是经过混合的,它们在相当程度上代表了自然居群的遗传多样性水平。在 50 多年时间内,一个濒临灭绝的物种,经过人类的迁地保育,达到目前已经超出其原有的分布区的范围的事实,也证实了人类对于水杉的迁地保育已经取得了相当程度的成功,但距离成功地完成水杉的保育还有许多工作要做。

栽培水杉的遗传多样性低于子遗居群,证明现在并没有对水杉母树进行了全面异地保存。但通过调查,原生地水杉母树的生长现状令人担忧。由于受生长年限和自然以及人为因素的影响,部分水杉母树的死亡在所难免,而每一母树的死亡将会使某些基因永远丧失。从 1988~2000 年的 12 年间,湖北利川已有 10 余株母树死亡(王希群和郭保香,2002)。李晓东等(2003)建议在水杉的原生地湖北利川市小河或桂花,建立水杉基因库保护林,使现存原生母树能够充分进行基因交流,最大限度的保存自然水杉的遗传多样性。据调查,现有水杉原生母树 254 株。水杉扦插易成活,适应性强,因此利用无性繁殖的方式保存全部水杉原生母树的基因是可能的。对于现有的栽培水杉居群,应开展广泛的遗传多样性研究,对于遗传多样性较低的居群(如上海居群),尽快收集来源背景差异较大、遗传多样性较高的水杉自然居群(如利川市小河或桂花居群)和栽培居群(如武汉和潜江林科所居群)的个体,补充进去,增加居群的遗传多样性,提高其进化潜势。对于今后的引种栽培,应收集更多母树来源的种子进行混合育苗,而生境和居群密度也应给予适当的考虑。李晓东(2002)通过对水杉原生生境调查发现生境复杂,原生母树较多的居群的遗传多样性较高;张志勇和李德铨(2003)研究发现五针白皮松生境较复杂的亚居群的遗传多样性也较高;汪小全等(1996)也提出生物的遗传变异水平往往会随着生境的复杂化而有相应的提高。相比于小居群,大居群不易丢失遗传多样性而维持其生态稳定(Lande,1988)。鉴于上述原因,引种栽培时应尽量选择适合水杉生存的、较为多样化的复杂生境,合理增加其种植密度,以提高栽培居群的适应性,保持其遗传多样性。

#### 3.2 丛枝水杉的分类地位

将 9 个丛枝水杉作为一个居群与其他 9 个居群聚类(图 2),可以看出这个居群并没有单独聚成一支,其聚类结果与其分散在两个居群时非常相似,单株聚类也没有聚在一起而是聚得比较混杂(图 4)。整个聚类分析结果不能将丛枝水杉和水杉明显地区分开来,而

在 PCR 扩增结果中也没有发现有特有位点产生，这显然与将丛枝水杉作为水杉的一个变种的分类学处理不符。由此可以认定丛枝水杉是水杉在遭受到冻害、风害、虫害或其它自然灾害而失去顶端优势后，促进了水杉侧生分生组织的生长和发育，而导致其形成大量丛生枝条。所以，本研究结果，不支持将丛枝水杉作为水杉的一个变种的分类处理。丛枝水杉的 9 个样本分别来自湖北潜江蚌湖种子园（BH）和湖北潜江广华（GH）居群，单株聚类结果显示出它们之间的近缘关系。例如丛枝水杉的 9 个样本，均首先分别和湖北潜江蚌湖种子园（BH）的样本和湖北潜江广华（GH）的样本聚在一起，而没有和其它 7 个水杉栽培居群的样本首先聚类。从亲缘关系上看，丛枝水杉应当归属于湖北潜江蚌湖种子园（BH）和湖北潜江广华（GH）居群，这与其分布现状也是吻合的。

致谢 本实验在中国科学院武汉植物园植物保育遗传学重点开放实验室完成。实验中得到姜正旺、康明的帮助；成文过程中得到刘义飞、许凤华、王英等同学的帮助；陈小勇博士、蔡清和王伟为本研究提供部分实验材料。

### 〔参 考 文 献〕

- 王洪新, 胡志昂, 1996. 植物繁育系统、遗传结构和遗传多样性的保护 [J]. 生物多样性, 4 (2): 92—96
- 李晓东, 2002. 孑遗植物水杉的遗传多样性及保护 [D]. 武汉: 中国科学院武汉植物园
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al*, 1987. Current Protocols in Molecular Biology [M]. New York: Wiley
- Bartholomew B, Boufford DE, Spongberg SA, 1983. *Metasequoia glyptostroboides*—Its present status in Central China [J]. *Journal of the Arnold Arboretum*, 64: 105—128
- Chaney RW, 1948. Redwoods in China [J]. *Natural History Magazine*, 47: 440—444
- Cheng WC (郑万钧), Chu CH (曲仲湘), 1949. Ecological study of the motherland of *Metasequoia* [J]. *Science in China* (科学), 31 (3): 73—80
- Chen XY, Li YY, Wu TY, *et al*, 2003. Size-class differences in genetic structure of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng (Taxodiaceae) plantations in Shanghai [J]. *Silvae Genetica*, 52 (3—4): 107—109
- Chu KL, Cooper WS, 1950. An ecological reconnaissance in the native home of *Metasequoia glyptostroboides* [J]. *Ecology*, 31 (2): 260—278
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 131: 479—491
- Eriksson G, Namkoong G, Robert J, 1995. Dynamic conservation of forest tree gene resource [J]. *Forest Genetic Resources*, 23: 2—5
- Fulling EH, 1976. *Metasequoia*: fossil and living [J]. *The Botanic Review*, 42: 215—315
- Francis CY, Yang RC. POPGENE VERSION 1.31 [Z], August 1999
- Fu LG, Yu YF, Mill RR, 1999. *Metasequoia* Hu & W. C. Cheng [A]. In Wu ZY, Raven P H eds. *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 4: 60—61
- Hu HH, 1948. How *Metasequoia*, the “living fossil” was discovered in China [J]. *The Journal of the New York Botanical Garden*, 49 (585): 201—207
- Hu HH, Cheng WC, 1948. On the new family Metasequoiaceae and on *Metasequoia glyptostroboides*, a living species of the genus *Metasequoia* found in Szechuan and Hupeh [J]. *Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology, New Series*, 1 (2): 153—161
- Hu HH (胡先), 1954. *Metasequoia glyptostroboides*, *Glyptostrobus pensilis* and *Ginkgo biloba* [J]. *Chin Bull Bio* (生物学通报), 3 (12): 12—15
- Hu SY, 1980. The *Metasequoia* flora and its phytogeographic significance [J]. *Journal of the Arnold Arboretum*, 61: 41—94
- Kuser JE, Sheely DL, Hendricks DR, 1997. Genetic variation in two *ex situ* collections of the rare *Metasequoia glyptostroboides* (Cupressaceae) [J]. *Silvae Genetica*, 46 (5): 258—264
- Kuser JE, 1999. *Metasequoia glyptostroboides*: Fifty years of growth in North America [J]. *Arnoldia*, 58(4)—59 (1): 76—79

- Lande R, 1988. Genetics and demography in biological conservation [ J ]. *Science*, **241**: 1455—1460
- Lewontin RC, 1972. The apportionment of human diversity [ J ]. *Evolutionary Biology*, **6**: 381—398
- Li LC (李林初), 1986. Karyotype study of *Metasequoia glyptostroboides* [ J ]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), **4** (1): 1—7
- Li JH (李建华), Ban JD (班继德), 1989. The water fir communities endemic to China [ J ]. *J Henan Nor Univ* (Nat Sci) (河南师范大学学报(自然科学版)), **4**: 49—55
- Li CX (李春香), Yang Q (杨群), Zhou JP (周建平), et al, 1999. RAPD analysis of genetic diversity in the natural population of *Metasequoia glyptostroboides*, Central China [ J ]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报(自然科学版)), **38** (1): 59—63
- Li XD (李晓东), Huang HW (黄宏文), Li JQ (李建强), 2003. Genetic diversity of relict plant *Metasequoia glyptostroboides* [ J ]. *Biod Sci* (生物多样性), **11** (2): 100—108
- Li XD (李晓东), Yang J (杨佳), Shi QF (史全芬), et al, 2005. Allozyme analysis of genetic diversity in eight cultivated populations of *Metasequoia glyptostroboides* [ J ]. *Biod Sci* (生物多样性), **13** (2): 97—104
- Li ZZ (李作洲), Gong JJ (龚俊杰), Wang Y (王瑛), et al, 2003. Spatial structure of AFLP genetic diversity of remnant populations of *Metasequoia glyptostroboides* (Taxodiaceae) [ J ]. *Biod Sci* (生物多样性), **11** (4): 265—275
- Ling H (林协), 1976. The living fossil—The past and the present *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng [ J ]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **14** (2): 51—54
- Long YH (龙耀华), Wu Y (吴越), 1984. A new variety of *Metasequoia glyptostroboides* [ J ]. *Bull Bot Res* (植物研究), **4** (1): 146—152
- Miki S, 1941. On the change of flora in eastern Asia since the tertiary [ J ]. *Journal of Japanese Botany*, **11**: 237—303
- Merrill ED, 1948. *Metasequoia*, another “living fossil” [ J ]. *Journal of Arnold Arboretum*, **8** (1): 1—8
- Miller JC, Tanksley SD, 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon* [ J ]. *Theoretical and Applied Genetics*, **80**: 437—448
- Miller MP, 1998. AMOVA-PREP 1.01: A program for the preparation of AMOVA input files from dominant-markers raw data [ Z ]. Computer software distributed by author
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [ J ]. *Genetics*, **89**: 583—590
- Rogers SO, Bendich AJ, 1985. Extraction of DNA from milligram amount of fresh, herbarium and mummified plant tissues [ J ]. *Plant Molecular Biology*, **5**: 69—76
- Rohlf FJ, 2000. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York [ M ]. New York: Exeter Publication Ltd., Setauket
- Sze HC (斯行健), 1951. On the cuticular structure of *Metasequoia* [ J ]. *Science in China* (中国科学), **2** (2): 239—243
- Satoh K, 1999. *Metasequoia* travels the globe [ J ]. *Arnoldia*, **58**(4)—**59** (1): 72—75
- Stebbins GL, 1948. The chromosomes and relationship of *Metasequoia* and *Sequoia* [ J ]. *Science*, **108**: 95—98
- Wang FH (王伏雄), Chien NF (钱南芬), 1964. The embryogeny of *Metasequoia glyptostroboides* [ J ]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **12** (3): 241—251
- Wilde J, Waugh R, Powell W, 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers [ J ]. *Theoretical and Applied Genetics*, **83**: 871—877
- Wang XQ (汪小全), Zou YP (邹喻苹), Zhang DM (张大明), et al, 1996. Genetic diversity of analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang [ J ]. *Science in China* (Ser. c) (中国科学 C 辑), **26**: 436—441
- Wang XQ (王希群), Guo BX (郭保香), 2002. Suggestion on the protection and the study of *Metasequoia glyptostroboides* [ J ]. *Forestry Science and Technology of Hubei Province* (湖北林业科技), **119**: 27—29
- Wang XQ (王希群), Ma LY (马履一), Guo BX (郭保香), 2004. History and research progress on the silviculture of *Metasequoia glyptostroboides* in China [ J ]. *J Northwest Forest Univ* (西北林学院学报), **19** (2): 82—88
- Yu YF (于永福), 1995. Origin, evolution and distribution of the Taxodiaceae [ J ]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **3** (4): 352—389
- Zhang WY (张文英), Li MH (李明鹤), 1994. A study on genetic variation of isozyme in *Metasequoia glyptostroboides* [ J ]. *J South China Agric Univ* (华南农业大学学报), **15** (2): 118—123
- Zhang ZY (张志勇), Li DZ (李德铎), 2003. Conservation genetics of an extremely endangered pine, *Pinus spumata* [ J ]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **25** (5): 544—550