

黑石顶南亚热带常绿阔叶林优势种群黄果厚壳桂的 AFLP 分析

张军丽, 王峥峰, 王伯荪, 李鸣光, 张炜银

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要:以扩增片段长度多态性(AFLP)分析了黑石顶南亚热带常绿阔叶林优势种群黄果厚壳桂(*Cryptocarya concinna*)在三个不同群落类型中的遗传多态性及遗传结构,并比较了该 3 个种群间的遗传分化。以 4 对 AFLP 选择引物组合产生了大量扩增表型带,用 AMOVA、PHYLIP 等软件分析计算了种群的遗传结构。结果表明黑石顶黄果厚壳桂种群具有高的种群内遗传多态性、低的种群间遗传分化。并讨论了种群遗传变化与生境的关系。

关键词:黄果厚壳桂;优势种群;AFLP;遗传结构;植物群落;分子生态

AFLP analysis in *Cryptocarya concinna*, a dominant population in lower subtropical evergreen broad-leaved forests at Heishiding Natural Reserve

ZHANG Jun-Li, WANG Zheng-Feng, WANG Bo-Sun, LI Ming-Guang, ZHANG Wei-Yin

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Amplification fragment length polymorphism (AFLP) was employed to analyze population genetic structure and variation of *Cryptocarya concinna*, a dominant species in lower subtropical evergreen broad-leaved forests. 37 individuals of *Cryptocarya concinna* from 3 different communities in Heishiding Natural Reserve were sampled and their DNAs were amplified using 4 AFLP selective primer combinations. 51 polymorphic phenotypic patterns (loci) were calculated and analyzed using Shannon information coefficient, AMOVA and PHYLIP for the genetic diversity and differentiation of the 3 *Cryptocarya concinna* populations. High genetic diversity with the population and low differentiation among the 3 populations were detected based on *SSD* (Sum of squared deviations), *MSD* (Mean squared deviations) and variance components of AMOVA statistic analysis. These were consistent with the results from Shannon coefficient calculation. Nei's genetic distance also indicated very low differentiation among the populations. The relationship of population genetic variation and the microhabitat was discussed.

Key words: *Cryptocarya concinna*; dominant population; AFLP; genetic structure; plant community; molecular ecology

文章编号:1000-0933(2001)03-0391-08 中图分类号:Q145 文献标识码:A

有关森林优势种群的遗传结构与变异的研究较早是以同工酶检测诸如欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)和加州闭果松类群(*Pinus* subsect *Oocarpae*)^[1,2]等天然林树种的等位基因分布与变异,之后,随着 DNA 分子

基金项目:国家自然科学基金(39670136)、教育部博士点基金(98055808)、华南生物科学与技术研究中心资助项目

感谢中国科学院武汉植物研究所钟扬教授提供 PHYLIP3.5c 软件及苏黎士大学 Excoffler 博士网上提供的 AMOVA1.55 软件

收稿日期:1999-03-21;修订日期:1999-12-25

作者简介:张军丽(1984-),女,贵阳市人,博士,副研究员。主要从事植物分子生态学研究。

标记技术的应用,此类研究迅猛发展。到现在,已对温带森林的优势种群^[3,4]、热带雨林的优势种群^[5,6]等类型的森林优势种群开展了一些分子生态的研究。我国有关方面的研究包括对红松(*Pinus koraiensis*)、红皮云杉(*Picea koraiensis*)、辽东栎(*Quercus liaotungensis*)等这些温带林优势种群的遗传结构与变化特征的报道,基本上都表明优势种群有较高的遗传多样性,而且种群间基因流动频繁^[7,8,9]。在对热带林树种优势种群遗传结构与分化的研究中,Hamrick 等^[10]发现这些树种具有高水平远交能力并在个体与种群间的遗传化随着地理距离的加大而增加 Chases 等^[11]发现新热带树种邻体间的基因流对其超种群(Metapopulation)中遗传变异的维持十分重要。Schierenbeck 等^[5]对热带雨林的几个广布的雌雄异株(Dioecious)种群的遗传研究中,采用 RAPD 分析了种群的遗传多样性,发现这些种群密度在沿海拔梯度变化的情况下,遗传组建很少随地理距离变化,其中的 3 个种群遗传多样性的 96.8% 以上在样方内,说明种群的花粉与种子传播在此空间距离上的有效,使得其遗传分化不大,仍说明这些种群在大范围内的基因交流频繁。Russell 等^[12]用 AFLP 检测了秘鲁亚马逊平原热带河岸占绝对优势的茜草科树种 *Calycophyllum spruceanum* 9 个种群的遗传变化,AMOVA 分析 65 个 AFLP 带的结果表明个体间 91% 的变化是在种群内。

以南亚热带常绿阔叶林优势种群为对象的分子生态研究工作仍非常少,有关黄果厚壳桂这一南亚热带林优势种群的生物学与生态学特征的研究已有一些报道^[13],而了解黄果厚壳桂在不同森林生态类型中分子水平上的遗传结构及变化,不同的群落类型其种群在分子水平上有什么变异对从微观水平认识宏观生态生态问题很重要,也是本研究对南亚热带常绿阔叶林优势种群分子生态的研究目的及拟解决的问题。

黄果厚壳桂(*Cryptocarya concinna*),属樟科(Lauraceae)植物,是南亚热带常绿阔叶林中重要的优势种群之一,分布于广东黑石顶、鼎湖山、罗浮山,以及台湾的南凤山等位于北回归线附近的地带性植被群落中^[14]。

在黑石顶森林群落组成中,黄果厚壳桂主要分布于海拔 250~550m 地段,在低山常绿阔叶林中是第一亚层和第二亚层的优势种^[15]。作为演替较高阶段的优势种群,黄果厚壳桂在鼎湖山厚壳桂群落中生物量和净第一生产力均占整个群落的 10%,这在维持群落结构的稳定性方面起着重要作用。在一些生物学特征如叶片结构特征参数上黄果厚壳桂也表现较稳定,说明种群内的小气候也相对稳定^[13]。

1 自然概况

黑石顶自然保护区位于北纬 23°27',东经 111°53',处南亚热带北缘,面积约 4000hm²。黑石顶气候为南亚热带季风气候,具有气候温暖,雨量充沛的特点,年平均气温 19.6℃,最冷月均温 10.6℃,无霜期 297d;年降雨水 1743.8mm,雨量集中在 4~9 月,相对湿度 80% 以上。黑石顶地质构造以泥盆纪花岗岩为主。地形起伏大,属低山山地地貌。一般海拔高度为 150~700m,主峰黑石顶高 927m。东南高而西北低,溪流众多。土壤为赤红壤,主要由花岗岩、砂页岩、砂岩等发育而成。植被覆盖好,水土流失少,枯枝落叶多,腐殖质相当丰厚,土壤发育良好,红壤和黄壤以海拔 750m 左右为界,880m 以上是山地草甸土^[16]。

黑石顶植被属南亚热带常绿阔叶林。其中亚热带常绿阔叶林的标志科,如樟科(Lauraceae)、壳斗科(Fagaceae)、山茶科(Theaceae)、木兰科(Magnoliaceae)、金缕梅科(Hamamelidaceae)、杜英科(Elaeocarpaceae)等所占属数及种数比例大。同时,热带性的茜草科(Rubiaceae)、豆科(Leguminosae)、桑科(Moraceae)的比例也不少^[16]。厚壳桂属(*Cryptocarya*)则是其表征属。

2 材料与方 法

2.1 材 料

在广东省黑石顶自然保护区选取 3 个不同群落类型:①大冲 23°27'12"N,111°53'02"E(GPS 定位)。森林群落是罗浮栲(*Castanopsis fabri*+水栗 *Castanopsis nigrescens*+硬叶稠 *Lithocarpus lohangwu*,森林类型为天然成熟林,黄果厚壳桂种群分布随海拔增高而减少。其样品采集以小树为主,沿海拔 400~550m 随机取样,样品序号为 13~20。②独田 23°27'33"N,111°53'02"E(GPS 定位)。森林类型为水栗(*Castanopsis nigrescens*-阿丁枫 *Altingia chinensis*+光叶红豆 *Ormosia glaberrima*-黄果厚壳桂 *Cryptocarya concinna*-华南省藤 *Calamus rotundus*)天然成熟林群落。黄果厚壳桂为下层优势种群,种群多度大,但多为小树或幼苗,样品采集以小树为主。沿海拔 320~400m 采集,样品序号 21~37。③船底窝 23°28'41"N,111°50'51"E

(GPS 定位)。优势种群为杉木 *Cunningamia lanceolata* + 马尾松 *Pinus massoniana* 及腺叶山矾 *Symplocos adenophylla* 等为主的早期演替群落类型,黄果厚壳桂分布不多,且多为林下树。样品沿海拔 250~300m 采集,样品株间相距至少 20m,以尽量避免同一母树的后代,样品序号为 1、12。

独田与大冲相距 1.3km,两地又距离船底窝 6.3km。

2.2 方法

在植物种群分子生态研究中采用多种分子标记方法,其中,AFLP 与其他 DNA 标记方法(如 RAPD 和 RFLP 等)相比,具有高的可重复性及可能检测到更多的多态位点(利用其选择性硷基长短来控制片段的多少)。AFLP 的数据分析与 RFLP 和 RAPD 相似,是基于相似性系数(Similarity index, SI)分析 DNA 带型^[17],并可在种群水平上根据 AFLP 表现型计算出其遗传结构和分化^[18],目前已越来越多地应用在植物种群分子生态研究中^[12,19,20]。

2.2.1 DNA 提取^[21] 取新鲜叶片约 0.5~1g 置于研钵中,加液氮研磨成细粉,置于 1.5ml 的离心管中,加入 1ml 的提取液(100mM Tris-HCl, 1.4M NaCl, 25mM EDTA, 2%CTAB, 0.1%β-巯基乙醇; pH8.0),振荡使成匀浆,在 65℃ 保温 1h,然后 10 000rpm 离心 10min。将上清液移入新的离心管并加入等体积的酚:氯仿(1:1),颠倒离心管使之乳化,离心分层,移至上清至新离心管中,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),颠倒乳化,离心,取上清于新离心管。加入 2.5 倍体积的乙醇,混匀, -20℃ 静置过夜;离心收集沉淀,溶于 50μl TE(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mMEDTA)缓冲液中。在 1% 琼脂糖胶上与标准对照测定 DNA 含量。

2.2.2 AFLP 测定^[22] 基因组总 DNA(约 250ng)加限制性内切酶 *EcoRI* 和 *MseI*(New England Co.) 各 5U,及 10× 缓冲液 2.5μl,超纯水至总体积 25μl,在 37℃ 保温 2h,然后 70℃ 灭活内切酶。加入 10pMEcoRI 接头,50pM *MseI* 接头,2UT₄ 连接酶及 1×T₄ 连接酶缓冲液(NE Co.),总体积至 50μl,在 16℃ 保温 16h 进行连接。连接后的产物做选择性 PCR 扩增^[22]。

实验选用的引物为:

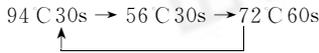
5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3' (E-AGG)

5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3' (E-ACT)

5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3' (M-CAG)

5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3' (M-CTC)

扩增在如下条件进行:扩增循环从 94℃(变性)60s,65℃(退火)60s,72℃(延伸)90s 开始,前 10 次循环每次循环退火温度下降 1℃,直到第 11 个循环。然后另 25 个循环在以下条件进行:



PCR 后的产物,用 5% 的变性聚安凝胶电泳分离,电泳后的凝胶用银染法^[23]显示结果。

2.2.3 数据分析 AFLP 方法在高等植物基因组中用这两种酶切的位点很多,利用引物+3 选择性硷基控制扩增的片段多少,每块序列胶可显示平均 50 个以上位点的表型带。AFLP 的扩增表型带以 0/1(无/有)计数。对多态性位点计数的标准以稳定性好、清楚易辨,至少有一个以上样品中现出(研究中选用基因频率≥5%的位点带),而又不是在所有样品中都有的表型带^[17]。

杂合性计算^[24]:

$$\hat{h} = 2n(1 - \sum x_i^2)/(2n - 1)$$

其中, n 为种群数, x_i 为 i 个位点的等位基因频率。

遗传结构分析 用 PHYLIP 软件计算 Nei 的遗传距离^[25]:

$$D = -\ln \frac{\sum_m \sum_i p_{1mi} p_{2mi}}{\sqrt{\sum_m \sum_i p_{1mi}^2} \sqrt{\sum_m \sum_i p_{2mi}^2}}$$

其中, m 为所有数据, i 是第 m 位点上的所有等位基因, p_{1mi} 代表种群第 m 个位点上第 i 个等位基因的频率。

Shannon-Wiener 多样性指数^[26]

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$$

式中, p_i 为第 i 个等位基因的频率。

以种群内平均多样性(H_{pop})及种群总的多样性(H_{sp}), 种群内($H_{\text{pop}}/H_{\text{sp}}$)及种群间($(H_{\text{sp}} - H_{\text{pop}})/H_{\text{sp}}$)的遗传多样性比例来衡量其种群遗传结构。

AMOVA^[27]遗传变化分析 AMOVA (Analysis of molecular variation) 是一套适合于单套基因组 (Haplotype) 或显性 (如 RAPD 等) 的遗传计算方法, 现在也用于 AFLP 等以 0/1 表型扩增带反映位点变化的遗传变化分析^[12, 28]。

AMOVA 以方差和 (Sum of squared deviations)、均方差 (Mean squared deviations)、变化成分 (Variation components) 以及 Φ_{st} 来反映种群遗传结构及变化情况。计算采用了欧氏距离系数^[28]:

$$d_{xy}^2 = \sum (x_i - y_i)^2$$

其中, x_i, y_i 分别表示第 i 位点上 x, y 样品中的 0/1 数据。

3 结果

本研究采用 AFLP 的 4 个引物组合, 在聚丙烯酰胺电泳凝胶上共显现出几百条扩增表型带。按标准计数的多态性位点带为 51 条 (见图 1)。

所得的种群遗传杂合度比较高, 平均杂合度达 0.3372。3 个不同种群的 4 对引物扩增产物杂合度平均值分别为船底窝 0.3459 ± 0.0470 (0.0542), 大冲 0.3564 ± 0.0253 (0.02922) 和独田 0.2621 ± 0.0952 (0.110)。以大冲的最高, 船底窝的接近, 而独田的较低。

4 对引物组合在 3 个不同群落类型中黄果厚壳桂种群的平均杂合度如表 1 所示。

表 1 3 个不同样点中黄果厚壳桂种群 AFLP 产物的遗传杂合度

Table 1 The AFLP genetic heterozygosity of *Cryptocarya concinna* population in three sites

引物对 Primer pairs	平均杂合度 $h(\pm SE)$		
	船底窝 Chuandiwo	大冲 Dachong	独田 Dutian
E-AGG M-CAG	0.3712 ± 0.00755	0.3333 ± 0.00904	0.1865 ± 0.00357
E-ACT M-CAG	0.3133 ± 0.00656	0.3778 ± 0.00910	0.2547 ± 0.00289
E-AGG M-CTC	0.4090 ± 0.00575	0.3852 ± 0.01063	0.4199 ± 0.00375
E-ACT M-CTC	0.2899 ± 0.00816	0.3292 ± 0.00916	0.1872 ± 0.00344

* 表中数据为遗传杂合度平均值 ± 标准误。The data represent means of genetic heterozygosity ± SE (standard error)

通过 Shannon-Wiener 信息指数计算表明, 黄果厚壳桂种群内很高的遗传多样性及 3 个种群间很小的遗传分化水平。遗传多样性以船底窝最高, 独田次之, 大冲较低 (表 2)。

表 2 4 组引物对 51 个多态位点体现的黄果厚壳桂 3 个种群内基因多样性 (H_0) 和平均值 (H_{pop}) 遗传多样性分布 (基于 Shannon-Wiener 信息指数)

Table 2 Genetic diversity and distribution of 51 AFLP loci in *Cryptocarya concinna* population amplified by 4 primer pairs (based on Shannon-Wiener indices)

H_0			H_{pop}	H_{sp}	$H_{\text{pop}}/H_{\text{sp}}$	$(H_{\text{sp}} - H_{\text{pop}})/H_{\text{sp}}$
船底窝 Chuandiwo	大冲 Dachong	独田 Dutian				
5.3951	5.2901	5.3626	5.3341	5.4987	0.9701	0.0299

万方数据

AMOVA 计算的黄果厚壳桂种群遗传多样性以变异成分百分比来衡量。代表种群间遗传分化的 Φ_{st}

只有 0.01。其中变异成分的 99% 以上都是在种群内,只有不到 1% 是在种群间(见表 3)。

表 3 AMOVA 计算黑石顶黄果厚壳桂 3 个种群 51 条 AFLP 扩增多态带的遗传多样性参数(基于 Euclidean 距离系数)
Table 3 AMOVA genetic diversity estimates of 51 AFLP polymorphic loci in 3 Heishiding *Cryptocarya concinna* populations

变化范围 Variety scale	SSD	MSD	变异成分 VC	%变化 % of total	Φ_{st}
种群内 Among populations	240.992	7.088	7.0876	99.05	0.01
种群间 Within populations	56.693	28.346	0.0681	0.95	

黄果厚壳桂的 3 个种群的 Nei 遗传距离分化以船底窝与大冲的分化最大,而与独田的距离次之,最小的是大冲与独田的遗传距离(表 4)。

表 4 3 个不同群落类型中黄果厚壳桂 51 个多态位点的 Nei 遗传距离

Table 4 Estimates of Nei's genetic distance of 51 AFLP polymorphic loci in three *Cryptocarya concinna* populations

	船底窝 Chuandiwo	大冲 Dachong	独田 Dutian
船底窝 Chuandiwo	0.0000		
大冲 Dachong	0.1327	0.0000	
独田 Dutian	0.0815	0.0647	0.0000

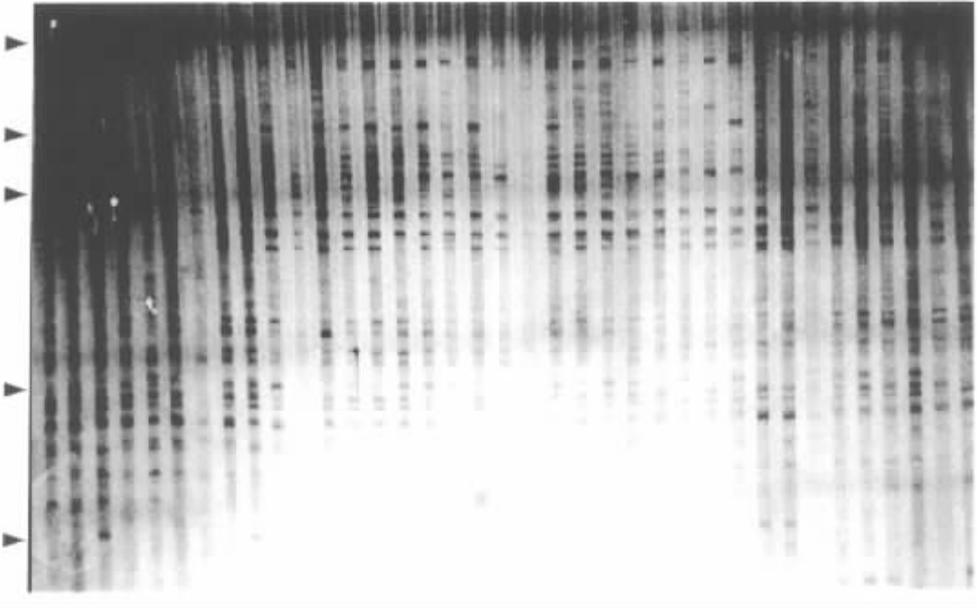


图 1 黄果厚壳桂种群在 E-AGG, M-CAG 引物组合下的 AFLP 扩增带,箭头所示为多态位点带

Fig. 1 AFLPs generated from genomic DNA of 37 individuals of *Cryptocarya concinna* using primer combination *EcoR* AGG-*Mse* CAG. Arrows indicate the some polymorphic locus bands

4 讨论

4.1 合适的分子标记

利用 AFLP 作为植物种群学研究的分子标记,在黄果厚壳桂种群的遗传结构与分化分析中表现出大量的多态性。与 RAPD 方法相比,该方法比 RAPD、RFLP 等优越,而又不象 RFLP 等操作繁琐。由于 AFLP 可检测到更多的遗传变化位点,而被检测到的多态位点也就更多。虽然利用银染法也可使 RAPD 分析的灵敏度提高

不少,但 AFLP 的作用原理使之能有更好的重现性和稳定性,而且可根据选择砵基的多少得到适合观测的谱带数^[22],特别是在平均每分析单位的带数上^[29]。而且由于采用 AFLP 分析,4 对引物组合可反映出几百个位点情况,在遗传分析中可因位点的增多而减小误差,对于自然种群来说基本上可反映种群杂合度情况^[24]。尽管所测结果表明黑石顶黄果厚壳桂种群的遗传分化很小,但在 3 个不同类型的群落中种群的遗传分化仍表现出较用 RAPD^[5]、RFLP^[6]等分子标记明显的结果,因而利用 AFLP 分析黄果厚壳桂等南亚热带常绿阔叶林优势种群的遗传结构与变化,以及在分子水平上研究种群在环境作用下的动态变化等具有其优越性及很大发展潜力。

4.2 种群遗传分析

正如对红皮云杉种群的研究发现从大兴安岭到长白山上千公里范围内仍有基因流动^[7,8];恽锐等在对中国栎属植物种群的遗传分析中发现栎属两种在从中国东北到华北形成一个地理渐变群,存在大范围、强大的双向基因流^[30],而地理分布在北京东灵山的辽东栎种群遗传结构则介于两者之间;有关长白松的遗传多样性也与赤松类群间的地理渐变关系^[3]相关等等,表明这些地带性优势种有其相似的遗传结构特征,即种群内遗传多样性高而种群间遗传分化低。Shannon-Wiener 信息指数计算结果表明,黄果厚壳桂船底窝种群内的遗传多样性较高,独田的次之,大冲较小。3 个种群内的平均遗传多样性为 5.33641,种群总的遗传多样性为 5.4987,所反映出的多样性水平比较用其他方法分析的高^[5,6,9]。而用以衡量遗传多样性分布的种群内比例(H_{pop}/H_{sp})为 0.9701,也就是说,遗传多样性在种群内占了 97%,种群间的分化($H_{sp} - H_{pop}$)仅为 0.0299。以欧氏距离系数的 AMOVA 计算结果也表明黄果厚壳桂种群内遗传多样性很高,而种群间的遗传分化很小(表 3),性很高、而通过变化成分及变化的百分率反映种群遗传多样性及分布情况的结果说明,多样性的 99.05%在种群内,只有不到 1%分布于处群间, Φ_{st} 也表明其种群间分化程度为 0.01。Nei 遗传距离的计算也得出类似结果(表 4)。

虽然转基因作物的基因流研究中报道对于作物(草本)来说基因流在一定范围内可受到阻碍^[31],但在高大的木本植物,特别是地带性优势种,这些多年生长寿木本种群,除了种群分布、种群大小的影响外,花粉的传播范围会大得多^[3,7~10]。在黑石顶地区,黄果厚壳桂种群间的基因交换是十分频繁的,从以上 3 个样点 AFLP 检测的遗传距离均提示出其花粉传播的有效性,在相距 6km 的范围内变化不大,这与 Schierenbeck 等^[5]对几种热带林主要树种种群的遗传分析表明其在 1~9km 范围内遗传组建不大的结果相似。而用 Shannon 信息指数,AMOVA 及 Nei 遗传距离计算的结果都说明在黑石顶地区的黄果厚壳桂种群通过传粉及种子传播反映出较广范围的基因交流,这与珍稀濒危植物种群的遗传结构形成对照,后者即使在小范围内也常表现出明显的种群间分化^[32]。在用 PHYLIP 软件中 PENNY 聚类分析中也可见 3 个群落类型的 37 个体之间并无明显的成簇(图 2)。而珍稀濒危种群即使在所测位点较少的情况下,也能表现明显的基因流阻碍^[32]。

4.3 种群大分子遗传结构与生境变化的关系

Shannon, AMOVA 及 PHYLIP 中 Nei 遗传距离 3 种遗传分析方法都表明黑石顶黄果厚壳桂 3 个不同群落种群间非常低的遗传分化水平,而 Shannon 和 AMOVA 分析的结果表明了结构与分化上的分配情况。黄果厚壳桂为南亚热带常绿阔叶林中的优势种,从它的分布及种群在群落演替中的格局、种群的生理生态特征也反映了这点^[14]。从黑石顶 3 个不同群落类型中黄果厚壳桂种群的 AFLP 遗传分析结果可看

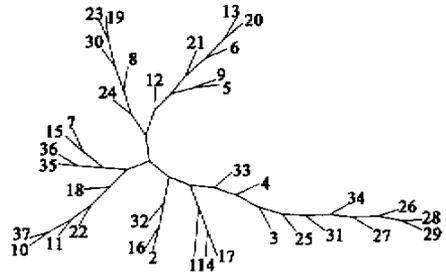


图 2 黄果厚壳桂 3 个不同种群 AFLP 扩增产物 51 个多态表型带 PENNY 分析(PHYLIP3.5)的相关树系图(数字为样品序号)

Fig. 2 The correlative dendrogram of AFLP amplified polymorphic products in *Cryptocarya concinna* populations based on PENNY program (PHYLIP3.5) (1~12: samples of Chuandiwo, 13~20: samples in Dachong, 21~37: samples from Dutian)

出不同生境在一定条件下对种群的遗传结构产生影响,表现在种群遗传结构上为:①3 个种群不同的遗传多样性水平及一定程度的分化;②在船底窝阳性群落中表现出的与生境相关的位点带。

鼎湖山永久样地的黄果厚壳桂种群动态的研究中,发现在南亚热带地带性植被代表性群落从先锋群落经过一系列演替阶段到达中生性顶极群落过程中,黄果厚壳桂种群增长曲线为近似 S 形的逻辑斯谛曲线,也就是说当阳生性树种侵入先锋树种林造成群落生境变化时,促进了黄果厚壳桂种群的增长^[13]。从 3 个不同群落的结构格局上可以看出船底窝的马尾松-杉木群落接近南亚热带植被演替中的先锋群落,在遗传结构上,黄果厚壳桂种群表现了较高的杂合度及遗传多样性,揭示分子水平可能比外部性状更敏感反映出群落格局变化的趋势;大冲群落类型接近中生性植物为主的常绿阔叶林,其种群遗传结构(杂合度与多样性指数)反映了该群落的基本较稳定的演替特征,与种群的生态分布格局相似^[13],即处于种群稳定发展阶段;独田的种群杂合度与 Shannon 多样性指数的差距较大,采集的黄果厚壳桂样品多为林下幼树,而可能造成采样误差。与热带林优势种群的遗传结构比较^[5],Nei 遗传距离仍能反映出一些与空间距离相关的分化,这一方面是由于采用 AFLP 作为分子标记,得到更多的多态位点,提高了检测的灵敏度;另外也可能由于南亚热带常绿阔叶林种群遗传结构因受较大环境变化的影响而较热带雨林的种群有更多些的分化。作为南亚热带常绿阔叶林的优势种群,黄果厚壳桂在该地带广泛分布,进一步的工作是开展更大范围内的种群遗传分析,以了解该种群更多更深入的分子生态与环境变化的关系。

在船底窝的黄果厚壳桂样品中,有些位点上出现特别的表型带,这提示了在这个由阳性向中生性过渡的群落类型中的特殊现象。这从另一方面提示了生境可能对种群中某些特殊(突变)位点产生随机固定作用,这些特别的基因片段大多不会是功能基因,但即使是一种冗余现象^[33],也说明基因组 DNA 在微环境作用下的变化(即使是量的变化)。这种与生态相关的分子证据为今后的研究提供了一个重要的线索,有利于更深入的研究和探讨种群分子生态的特征及变化。

参考文献

- [1] Müller-Starck G. Reproductive systems in conifer seed orchards. I Mating probabilities in a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. *Silvae Genet.*, 1982, **31**: 188~197.
- [2] Millar CI, Strauss SH, Conkle MT, et al. Allozyme differentiation and biosystematics of the Californian closed-cone pines (*Pinus* subsect, *Oocarpae*). *Syst. Bot.*, 1988, **13**: 351~370.
- [3] Szmidt AE, Wang XR. Molecular systematics and genetic differentiation of *Pinus sylvestris* (L.) and *P. densiflora* (Sieb. et Zucc.). *Theor. Appl. Genet.*, 1993, **86**: 841~845.
- [4] Dow BD, Ashley MV. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak. *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology*, 1996, **5**: 615~627.
- [5] Schierenbeck KA, Skupski M, Leiberman D, et al. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species from Costa Rica. *Molecular Ecology*, 1997, **6**: 137~144.
- [6] Gillies A C M, Cornelius J P, Newton A C, et al. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L. Assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*, 1997, **6**: 1133~1145.
- [7] 杨一平, 尹瑞雪, 张军丽. 长白山天然红松林同功酶遗传变异的研究. *东北林业大学学报*, 1986, **14**(2): 34~42.
- [8] 杨一平, 尹瑞雪, 张军丽. 红皮云杉自然群体遗传多样性及遗传分化的研究. *植物学报*, 1993, **35**(6): 458~465.
- [9] 恽锐, 钟敏, 王洪新, 等. 北京东灵山辽东栎种群 DNA 多样性的研究. *植物学报*, 1998, **40**(2): 169~175.
- [10] Hamrick JL, Murawske DA. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon Neotropical tree species. *Journal of Tropical Ecology*, 1991, **6**: 307~319.
- [11] Chase M, Kesseli R, Bawa K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *Amer. J. Bot.*, 1996, **83**: 51~57.
- [12] Russell JR, Weber JC, Booth A, et al. Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin. *Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis*. *Molecular Ecology*, 1999, **8**: 199~204.

- [13] 彭少麟,李丹. 黄果厚壳桂种群生态学特征. 生态学报,1999,19(4):485~489.
- [14] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第31卷(樟科,莲叶桐科). 北京:科学出版社,1982. 455~456.
- [15] 陈章和,王伯荪,张宏达. 南亚热带常绿阔叶林的生产力. 广州:广东高等教育出版社,1996.
- [16] 王伯荪,刘雄恩. 黑石顶自然保护区的植物特点. 生态科学,1987,(1,2),1~18.
- [17] Waugh R. RAPD analysis: genomic identification, character marking and mapping. IN: Clack ed. *Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual*. 1997, 236~258.
- [18] Sharma S K, Knox M R, Ellis T H N. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93: 751~758.
- [19] Beismann H, Barker JHA, Karp A, et al. AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. *Molecular Ecology*, 1997, 6: 989~993.
- [20] Lerceteau E, Szmidt AE. QTL mapping wood production and wood quality traits in *Pinus sylvestris* L. Using AFLP markers. *Eighteenth International Congress of Genetics*, 8P240, 1998, 176.
- [21] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.*, 1987, 19: 11~15.
- [22] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407~4414.
- [23] Mitchen LG, Bodenteich A, Merrill CR. Use of silver staining to detect nucleic acids. In: Harwood AJ ed. *Basic DNA and RNA protocols*. Human Press, Totowa, New Jersey. 1996. 97~103.
- [24] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press. 1987.
- [25] Felsenstein J. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5 c*. Seattle: University of Washington, 1993.
- [26] Lewontin RC. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 1972, 6: 281~304.
- [27] Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 1992, 131: 479~491.
- [28] Barrett BA, Kidwell KK. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Science*, 1998, 38(5): 1261~1271.
- [29] Russell JR, Fuller JD, Macaulay M, et al. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet*, 1997, 93: 714~722.
- [30] 恽锐,王洪新,胡志昂,等. 蒙古栎、辽东栎的遗传分化: 从形态到 DNA. 植物学报, 1998, 40(11): 1040~1046.
- [31] 魏伟,钱迎倩,马克平. 转基因作物与其野生亲缘种间的基因流. 植物学报, 1999, 41(4): 343~348.
- [32] Martin C, Gonzalez-Benito ME, Iriondo JM. Genetic diversity within and among population of a threatened species: *Erodium paularense* Fern. Gonz. & Izco. *Molecular Ecology*, 1997, 6: 813~820.
- [33] Tautz D. Redundancies, development and the flow of information. *BioEssays*, 1992, 14(4): 263~266.