

岛屿植物舟山新木姜子居群遗传多样性的 RAPD 分析

王中生¹, 安树青^{1*}, 冷 欣¹, 丁方明², 郑建伟¹, 陈 琳¹

(1. 南京大学生命科学院, 南京 210093; 2. 浙江舟山市林科所, 舟山 316000)

摘要:基于随机扩增多态 DNA(RAPD)方法分析了舟山群岛濒危植物舟山新木姜子(*Neolitsea sericea*)6 个居群的遗传多样性及分化程度。10 条随机引物扩增出 84 个可分析位点, 多态位点百分比(*PPL*)为 38.10%。经 POPOGENE 分析发现, 舟山新木姜子居群平均水平的多态位点百分比(*PPL*)为 23.18%, Nei's 基因多样性(H_E)为 0.0793, Shannon 信息指数(H)为 0.1201, 与其它岛屿植物比较具有中等偏低水平的遗传多样性; 岛屿各居群间遗传分化程度较高($G_{ST}=0.3646$); 地理距离与遗传距离之间具有显著相关性($r=0.7697$, $P=96.62\%$), 岛屿隔离效应是导致居群间遗传分化的重要因素。结合居群遗传多样性及 UPGMA 聚类分析, 推测普陀山岛舟山新木姜子部分个体可能为大猫岛迁入的后裔, 而朱家尖岛舟山新木姜子则由人为移植自普陀山岛。基于舟山新木姜子的物种保护及资源利用, 建议加强现有自然居群的就地保护, 促进居群自然更新; 建立种质资源库, 收集不同岛屿的种源进行混合繁殖, 促进基因交流; 选育优良品系用于海岛植被恢复及园林观赏。

关键词: 岛屿; 舟山新木姜子; RAPD; 遗传多样性; 居群分化; 地理隔离

Population genetic diversity of the insular plant *Neolitsea sericea* based on random amplified polymorphic DNA (RAPD)

WANG Zhong-Sheng¹, AN Shu-Qing¹, LENG Xin¹, DING FANG-Ming², ZHENG Jian-Wei¹, CHEN Lin

(1. School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Zhoushan Forestry Institute of Zhejiang, Zhoushan 316000, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3): 414~422.

Abstract: The Zhoushan archipelago is the largest archipelago in China. It separated from the mainland about 9000 years ago due to rising sea level and climate change. Because of the long-term influences of human activities, forest vegetation on the larger islands was badly damaged and plant diversity reduced. The remaining plants are deserving of attention, especially the 21 endangered plant species distributed in the archipelago. Genetic diversity and genetic differentiation were examined in six populations of the insular endangered plant *Neolitsea sericea* in Zhoushan archipelago using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. A total of 84 discernible loci were obtained for all populations using 10 primers, 38.10% of which were polymorphic ($PPL=38.10\%$). As analyzed by POPOGENE, average percentage of polymorphic loci ($PPL=23.18\%$), Nei's genetic diversity ($H_E=0.0793$) and Shannon's information index ($H=0.1201$) indicated that *Neolitsea sericea* had a lower level of genetic diversity than other insular plants. The high value of differentiation ($G_{ST}=0.3646$) indicated that geographic isolation strongly influenced genetic differentiation among populations, and a significant correlation was found between genetic distance and geographic distance ($r=0.7697$, $p=96.62\%$). The combined information from analyses of genetic diversity and UPGMA indicated that some individuals on Putu Island were immigrants from Damao Island, and that populations on

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070134)

收稿日期: 2003-08-25; **修订日期:** 2003-12-15

作者简介: 王中生(1972~), 男, 安徽桐城人, 博士, 讲师, 主要从事植物生态学及分子系统学研究。E-mail: Wangzs@nju.edu.cn

* **通讯作者** Author for correspondence, E-mail: anshq@nju.edu.cn

致谢: 感谢浙江大学生命科学院邱英雄博士、中国科学院武汉植物研究所李晓东博士以及舟山市林科所俞慈英高工的热情帮助!

Foundation item: the National Natural Science Foundation of China(No. 30070134)

Received date: 2003-08-25; **Accepted date:** 2003-12-15

Biography: Wang Zhong-Sheng, Ph. D., Lecture, mainly engaged in the research of plant ecology and molecular systematics. E-mail: Wangzs@nju.edu.cn

Zhujiajian Island had been translocated from Putu Island by human activities. Management strategies were proposed for species conservation and resource utilization for *Neolitsea sericea*. These included (a) in situ protection from human disturbance to facilitate natural regeneration, and (b) construction of germplasm resources and cultivate plants collected from insular populations for use to enhance gene flow, and to select elite lines for vegetation restoration and gardening applications on islands.

Key words: island; *Neolitsea sericea*; RAPD; genetic diversity; population differentiation; geographical isolation

文章编号: 1000-0933(2004)03-0414-09 中图分类号: Q143 文献标识码: A

基于岛屿生物多样性、物种入侵与灭绝、分化与成种的研究自达尔文时代至今,一直是生态学及进化生物学研究的重要内容^[1~4]。岛屿生物地理理论^[5,6]被誉为近代岛屿生物学的里程碑性成果^[7],认为均等机会下的岛屿物种入侵与灭绝的随机过程最终将达到一平衡状态,取决于岛屿面积及其离开入侵种源(colonizing species)的距离,但“物种—面积”曲线并没有考虑岛屿特有物种的存在等根本事实^[7~9]。岛屿生境异质性及其与邻近岛屿、陆地基因流的阻隔将导致岛屿新物种的产生,岛屿物种多样性很大程度上受到岛屿特有种分化的驱动^[4,7,9],加拉帕戈斯群岛特有植物占整个植物区系的 42%,并不完全由“入侵—灭绝”的动态过程所调节的^[10]。

随着各种分子标记及序列分析在进化生物学等领域的广泛应用,岛屿物种入侵与灭绝的遗传背景、居群遗传多样性及遗传变异的分布、分化与成种等已成为现代岛屿生物地理学研究的热点内容^[4,8,11]。加拉帕戈斯群岛的嘲鸫(被称为 Darwin’s finch)、卡拉里群岛 *Nesotes* 属的甲虫、夏威夷群岛 silverwords 植物群以及大安德列斯群岛的蜥蜴等著名的研究案例说明分子系统发育研究为重构岛屿物种入侵、分化成种、适应性辐射的时空过程以及灭绝历史等提供了可能^[4],极大充实了岛屿生物地理理论的内涵,为深刻理解岛屿生物多样性的形成过程与机制、并提出相应的保护策略提供了科学的参考依据。

本研究选择中国最大的群岛——舟山群岛为研究地点,利用 RAPD 分子标记分析岛屿植物舟山新木姜子(*Neolitsea sericea*)居群的遗传多样性,主要目的为:(1)揭示舟山新木姜子居群的遗传结构及遗传多样性水平;(2)分析岛屿地理隔离对舟山新木姜子居群遗传分化的影响;(3)为舟山新木姜子的岛屿生境保护及引种栽培提供建议。

1 舟山群岛自然概况

舟山群岛位于长江口以南,杭州湾外缘的东海海域中,29°32′~31°04′N,121°31′~123°25′E,为我国第一大群岛。大小岛屿共计 1339 个,海域总面积 $2.08 \times 10^4 \text{ km}^2$,陆地总面积 $0.14 \times 10^4 \text{ km}^2$,面积超过 1 km^2 的岛屿有 58 个,以舟山岛最大,面积为 468.7 km^2 。舟山群岛地质构造属闽浙隆起带东北端,为天台山东北方向之余脉,至全新世中期新构造运动及多次海侵而逐渐与大陆分离形成,地史较为年轻,距今约 7000~9000 余年。岛屿多为一山一谷地形,属里亚斯型海岛,距离陆地最近处不足 5km。

由于受海洋环流影响显著,舟山群岛属中亚热带北缘典型季风气候区,全年风日多、风力大。岛屿地表为上侏罗纪陆相火山岩系的流纹岩、凝灰岩、石英斑岩等,形成海岛地区特殊的饱和红壤及滨海盐土。

植被类型属中亚热带常绿阔叶林北部亚地带的“浙闽山区甜槠、木荷林区”^[12],但甜槠(*Castanea eyrei*)、木荷(*Schima superba*)等特征树种并未发现^[13]。由于舟山群岛人居历史悠久,原生森林植被遭严重破坏,岛屿丘陵山地植被以人工黑松(*Pinus thunbergii*)林和马尾松(*P. massoniana*)林为主,少量次生常绿阔叶林残存于普陀山、桃花岛、朱家尖、大猫岛、洛伽山等人为影响较小的沟谷地带。群岛与外界植物交流过于频繁,岛屿特有植物相对贫乏,但天然分布的濒危植物达 21 种^[14],如普陀鹅耳枥(*Carpinus putuensis*)、舟山新木姜子、普陀樟(*Cinnamomum japonica*)等;植物区系与日本最为相似,共有种占 65.8%,与台湾岛共有种约 60%,与陆地西天目山植物区系关系也较为密切^[13]。

2 材料与方法

2.1 材料采集

舟山新木姜子为樟科(Lauraceae)新木姜子属(*Neolitsea*)子遗植物,主要分布于浙江舟山群岛及台湾岛、日本的琉球岛、四国岛、九州、本州等岛屿以及朝鲜半岛的沿海岛屿(上海崇明佘山岛有分布记载,但未见标本)。因其分布区狭小,种源稀少被列为我国二级保护植物。浙江舟山群岛目前百年以上大树仅存 5 株,30a 以上成年母株 80 余株,零散分布于普陀山、大猫、桃花、朱家尖、六横等岛屿^[15]。舟山新木姜子具有优良的观赏及用材价值,于 20 世纪 80 年代后期开始大量人工繁殖,并被确立为舟山市“市树”。

依据前期调查,选择 4 个主要分布岛屿,进行居群采样(表 1)。桃花岛(TH)包括大佛岩居群(DF)、茶山岙居群(CH),大猫岛(DM)包括冷坑居群(LK)和长坑居群(CK),普陀山岛(PT)为佛顶山居群(FD),朱家尖岛(ZJ)仅有将军山居群(JS),共计 6 个居群,采样点分布见图 1。居群采样过程中,分布较为集中的桃花岛、大猫岛以随机采样为主(间隔 30~60m),而普陀山岛、朱家尖岛因成年株数较少,采样间隔距离相对较小(30m)。对采样植株分别进行挂牌编号,胸径(DBH)均大于 10cm。新

鲜叶片采集后在居地(舟山市林科所)经蒸馏水清洗、擦干,并用硅胶干燥保存。

表 1 舟山群岛舟山新木姜子成年植株的分布以及采样地点、株数等

Table 1 Distribution, sampling location and size of <i>Neolitsea sericea</i> in the Zhoushan Archipelago						
岛屿 Island	成年株数 No. of adult trees	估计树龄 Estimated age(a)	植被类型 Type of vegetation	采样地点 Sampling site	海拔 Altitude (m)	采集株数 Sampling size
桃花岛 (TH) Taohua Island	60	15~35	常绿落叶阔叶混交林 Mixed evergreen and deciduous broad-leaved forest	大佛岩 (DF) Dafuyan	80	9
大猫岛 (DM) Damao Island	85	15~100	常绿落叶阔叶混交林 Mixed evergreen and deciduous broad-leaved forest	茶山岙 (CH) Chashanao	100	13
				长坑 (CK) Changkeng	60	13
				冷坑 (LK) Lengkeng	15	8
普陀山岛 (PT) Putu Island	20	15~100	常绿阔叶林 Evergreen broad-leaved forest	佛顶山 (FD) Fudingshan	250	7
朱家尖岛 * (ZJ) Zhujiajian Isalnd	21	15~40	常绿阔叶林 Evergreen broad-leaved forest	将军山 (JS) Jiangjunshan	40	7
舟山岛 ** Zhoushan Island			栽培 Cultivated			
岱山岛 Daishan Island	1	60	栽培 Cultivated			
六横岛 Liuheng Island	3	20~30	栽培 Cultivated			

* 朱家尖岛仅分布于将军山民居旁边,可能为人工栽培 Population of *Neolitsea sericea* was distributed beside of houses in Jiangjunshan, Zhujiajian Island, which would be cultivated; ** 舟山岛广为栽培,为舟山市“市树”,未作全面统计 As “Tree of City”, *Neolitsea sericea* was cultivated broadly in Zhoushan City, so the individuals on Zhoushan Island were not calculated

2.2 总 DNA 提取

采用改良的 CTAB 方法^[16]提取总 DNA。因舟山新木姜子叶片多粘性物质,需经氯仿/异戊醇反复抽提,通过含 EB 的 1% 琼脂糖 (Promega 公司产品)凝胶电泳及 EPSON 紫外自动成像仪观察比较,以选取带型清晰、无明显拖尾的 DNA 样品,并经紫外分光光度计 (Eppendorf Biophotometer, Germany) 检测模板浓度。

2.3 PCR 扩增与引物筛选

购买 Operon 公司 100 条 10 碱基的 RAPD 随机引物。优化后 25μl PCR 扩增反应液包括 2.5μl 10×Buffer (Mg²⁺ free)、2μl MgCl₂ (25mmol/L)、dNTPs (各 10mM) 0.5μl、Taq 酶 (5u/μl) 0.2μl、BSA (1mg/ml) 0.25μl、1μl Primer (5μmol/L)、模板 1μl (50ng)、灭菌双蒸水 17.5μl。(注:上述试剂除 Primer 外,均为 Promega 公司产品)。PCR 扩增在 PE-9600 扩增仪上进行。优化后扩增程序为:94℃,3min;进入第一次 5 个循环 (94℃,0.5min; 35℃,1min;72℃,2 min),然后进入第二次 40 个循环 (94℃,0.5min;36℃,1min;72℃,1.5min);循环结束后 72℃延长 7min。PCR 产物在含有 EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳,以 DNA 分子量标准 Marker (GeneRuler100 ladder, MBI 公司) 作为对照, EPSON 紫外自动成像仪照相。

每个居群选取 3 个材料的 DNA 模板,以灭菌双蒸水为对照,从 100 条引物中选出 10 条扩增条带清晰、多态性高、重复性可靠的引物用于一个居群所有样品的 PCR 扩增,引物编号为:OPA11、OPA12、OPB08、OPB11、OPB12、OPB17、OPC01、OPC02、OPC04、OPC11。

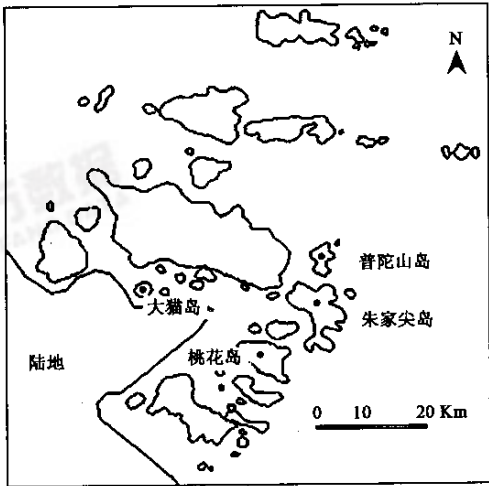


图 1 舟山新木姜子采样岛屿分布图

Fig. 1 Map showing sampling islands of *Neolitsea sericea* in the Zhoushan archipelago

2.4 数据处理

电泳图谱中每一扩增条带代表引物的一个结合位点,均视为有效的分子标记。基于电泳迁移率相等的条带是相同 DNA 片段扩增产物的假设,对照分子量标准 Marker,判读电泳图谱中扩增条带的有无及其分子量大小,将电泳图谱中较为清晰的条带(包括弱带)计作“1”,无则计作“0”,转换为 0/1 二元数据。运用 POPGENE Version 1.31 软件^[17]分别对 4 个岛屿上的 6 个居群进行各类遗传参数分析,包括多态性位点百分比(PPL)、观测等位基因数(A_o)、有效等位基因数(A_e)、Nei's 基因多样性(H_E)、Shannon's 多态性信息指数(H)、居群总基因多样性(H_T)、居群内基因多样性(H_S)、各居群间遗传分化指数(G_{st})、Nei's 遗传距离(D)和遗传一致度(I)等;并根据 Nei's 遗传距离,利用 NTSYSpc Version 2.10 软件^[18]对舟山新木姜子 6 个居群和 57 个单株分别进行 UPGMA 聚类分析。同时以岛屿为居群单位(即每个岛屿以一个居群统计),分析岛屿间遗传距离(POPGENE Version 1.31 软件)与地理距离之间的相关性(Mantel 检验)。

3 结果与分析

3.1 舟山新木姜子居群及物种水平的 RAPD 遗传多样性

利用筛选的 10 条 RAPD 引物,对舟山新木姜子 6 个居群的 57 份 DNA 样品进行 PCR 扩增,每条引物扩增出的位点数目为 7 至 10 条不等,位点分子量范围在 100~3000bp 之间(图 2,引物 OPC04 对桃花岛大佛岩居群及茶山岙居群的扩增图谱)。读带结果共计 84 个可分析位点,其中多态位点 32 个,占 38.10%。

大猫岛冷坑(LK)、长坑(CK)居群多态位点百分比(PPL)较高,分别为 28.57%和 25%(见表 2);次之为桃花岛大佛岩(DF)、茶山岙(CH)居群, PPL 均为 22.62%;普陀山岛佛顶山居群(FD)与朱家尖岛将军山居群(JS)的 PPL 较为接近,分别为 20.24%、19.50%。居群 Nei's 遗传多样性以大猫岛冷坑居群(LK)最高($H_E=0.0956$),而朱家尖岛将军山居群(JS)最低,仅为 0.0646。Shannon's 多态性信息指数(H)与 Nei's 遗传多样性(H_E)及 PPL 在各居群中的变化趋势相一致。6 个居群平均水平的各类遗传多样性参数($PPL=23.18\%$, $A_o=1.2318$, $A_e=1.1299$, $H_E=0.0793$, $H=0.1201$)均低于物种水平($PPL=38.10\%$, $A_o=1.3810$, $A_e=1.2119$, $H_E=0.1258$, $H=0.1906$)。

多态位点百分比(PPL)、Nei's 遗传多样性(H_E)、Shannon's 多态性信息指数(H)在 4 个岛屿中,均以大猫岛居群(LK、CK)最高,其次分别为桃花岛(DF、CH)、普陀山岛(PT)与朱家尖岛(ZJ)。大猫岛人居较少,海域交通不便,岛屿植被以常绿落叶阔叶混交林为主,林相完整,群落演替稳定。舟山新木姜子目前仅有的 5 株百年以上大树有 2 株分布于大猫岛,成年个体 85 株(>15a),为舟山新木姜子分布最为集中的岛屿,居群遗传多态性明显较高。桃花岛与大猫岛植被类型相似,成年株数(>15a)较多,遗传多样性水平接近于大猫岛,但近年来旅游业的兴起对舟山新木姜子适宜生境的影响不容忽视。

普陀山岛为著名的佛教胜地,分布有 3 株百年以上的舟山新木姜子,但由于普陀山岛种源幼叶背面密被金黄色绢毛,极具观赏价值并被赋予宗教内涵,常被引种至其它岛屿,目前该岛成年个体仅存 20 余株,且林下幼苗极少。根据调查,朱家尖岛将军山民居旁边分布的舟山新木姜子可能为人工引种自普陀山岛。两岛居群遗传多样性水平接近,均低于大猫岛与桃花岛。

3.2 居群间遗传分化

根据 Nei's 总基因多样性(H_T)和居群内基因多样性(H_S)的分布,计算不同居群之间的遗传分化指数 G_{st} ($G_{st}=1-H_S/H_T$)。舟山新木姜子居群总基因多样性(H_T)为 0.1248,居群内基因多样性(H_S)为 0.0793,居群间遗传分化指数 $G_{st}=0.3646$ (见表 3),即 36.46%的变异存在于居群之间,居群内变异占 63.54%,说明岛屿各居群间存在一定的遗传变异。

3.3 居群间遗传距离与遗传一致度

基于 Nei's 遗传一致度(I)和遗传距离(D)可进一步分析居群间的遗传分化程度^[19]。舟山新木姜子 6 个居群中(见表 4),以桃花岛大佛岩居群(DF)与普陀山岛佛顶山居群(FD)间遗传一致度最低($I=0.9197$),相应的遗传距离最远($D=0.0837$);而普陀山岛佛顶山居群(FD)与朱家尖岛将军山居群(JS)遗传一致度最高($I=0.9823$),遗传距离最小($D=0.0178$),甚至低于同一岛屿内 2 个居群间的遗传距离,如大猫岛冷坑(LK)、长坑(CK)居群间的遗传距离 D 为 0.0283。

比较每个岛屿间(每个岛屿以一个居群单位统计)的遗传距离和地理距离(见表 5),则以桃花岛居群(TH)与普陀山岛居群(PT)遗传距离最近($D=0.0667$),地理间隔最远(18km);而普陀山岛居群(PT)与朱家尖岛居群(ZJ)之间遗传距离最小($D=0.0178$),地理距离最近(4km)。经 Mantel 检验,地理距离与遗传距离之间存在显著相关性,相关系数 r 为 0.7697, P 等于

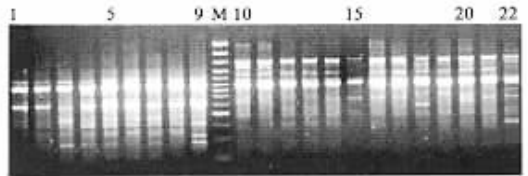


图 2 引物 OPC04 对桃花岛大佛岩居群(DF,泳道 1~9)、茶山岙居群(CH,泳道 10~22)舟山新木姜子样品的扩增谱带,M 为 DNA 分子量标准 Marker(100~3000bp)

Fig. 2 RAPD bands of *Neolitsea sericea* samples amplified with OPC04 Lanes 1~9 belong to population DF; Lanes 10~22 belong to population CH; M: DNA ladder (100~3000bp)

96.62% ($P(\text{random } Z < \text{observed } Z) > 95\%$, 为显著相关, $P > 90$ 呈弱相关), 表明岛屿地理隔离效应是导致岛屿居群间遗传分化的重要因素。

表 2 舟山新木姜子居群遗传多态性

Table 2 Genetic diversity for populations of <i>Neolitsea sericea</i>						
居群 Population	个体数 Sample size	多态位点百分比 <i>PPL</i>	观测等位基因数 <i>Ao</i>	有效等位基因数 <i>Ae</i>	Nei's 基因多样性 <i>H_E</i>	Shannon's 信息 指数 <i>H</i>
DF	9	22.62	1.2262	1.1134	0.0718	0.1110
标准差 Standard deviation			0.4209	0.2402	0.1428	0.2149
CH	13	22.62	1.2262	1.1304	0.0803	0.1214
标准差 Standard deviation			0.4209	0.2610	0.1547	0.2304
LK	8	28.57	1.2857	1.1547	0.0956	0.1457
标准差 Standard deviation			0.4545	0.2775	0.1630	0.2422
CK	13	25.00	1.2500	1.1525	0.0929	0.1391
标准差 Standard deviation			0.4356	0.2791	0.1656	0.2455
FD	7	20.24	1.2024	1.1221	0.0703	0.1052
标准差 Standard deviation			0.4042	0.2856	0.1544	0.2234
JS	7	19.50	1.1905	1.1065	0.0646	0.0981
标准差 Standard deviation			0.3950	0.2504	0.1431	0.2117
居群平均水平 Population mean level	9.5	23.18	1.2318	1.1299	0.0793	0.1201
物种水平 Species level	57	38.10	1.3810	1.2119	0.1258	0.1906
标准差 Standard deviation			0.4885	0.3332	0.1825	0.2652

PPL, the percentage of polymorphic loci; *Ao*, observed number of alleles; *Ae*, effective number of alleles; *H_E*, Nei's gene diversity; *H*, Shannon's information index

3.4 居群及单株聚类分析

根据 Nei's 遗传距离所构建的 6 个居群 UPGMA 图(图 3)表明同一岛屿内的居群明显聚为一支,如桃花岛分支(TH)包括大佛岩居群(DF)和茶山岙居群(CH),而长坑居群(CK)和冷坑居群(LK)则构成大猫岛分支(DM)。桃花岛居群(DF, CH)与普陀山岛佛顶山居群(FD)、朱家尖岛将军山居群(JS)遗传分化最为显著,而普陀山岛佛顶山居群(FD)与朱家尖岛将军山居群(JS)具有较近的亲缘关系。

在单株 UPGMA 聚类图(图 4)中桃花岛 2 个居群的所有个体首先构为一支,而大猫岛居群(CK、LK)的部分个体与普陀山岛佛顶山居群(FD)、朱家尖岛将军山居群(JS)构成一大分支,岛屿间个体可能存在亲缘关系;普陀山岛佛顶山居群(FD)和朱家尖岛将军山居群(JS)的个体间相互混杂,构成一大分支,亲缘关系非常密切,结合居群间遗传多样性(*H_E* 分别为 0.0703, 0.0646)及遗传距离($D=0.0178$)的分析,可以证实朱家尖岛舟山新木姜子引种自普陀山岛的说法。

4 讨论

4.1 舟山新木姜子遗传多样性

Frankham (1997)^[20]对 202 组岛屿居群与陆地居群的等位酶遗传多样性进行了比较分析(包括哺乳类、鸟类、爬行类、鱼类、昆虫以及植物等),在 165 组案例中(占 81.7%)岛屿居群表现出较低的遗传多样性,平均降低 29%;在 38 组岛屿特有种与陆地近缘种等位酶遗传多样性比较中,仅有 4 例(占 10.5%)岛屿特有种具有较高的遗传多样性。岛屿特有植物与陆地近缘种的杂合度比值($H_{Is}/H_M=0.54$, 13 个案例),低于岛屿非特有植物与陆地同种居群的杂合度比值($H_{Is}/H_M=0.71$, 10 个案例),岛屿特有植物的遗传多样性较岛屿非特有植物更低。

岛屿植物舟山新木姜子 RAPD 标记分析中 6 个居群平均水平的多态带百分比(*PPL*)为 23.18%,有效等位基因(*Ae*)为

表 3 舟山新木姜子居群间的遗传分化

Table 3 Genetic differentiation for populations of <i>Neolitsea sericea</i>			
居群 Population	Nei's 总基 因多样性 <i>H_T</i>	Nei's 居群内 基因多样性 <i>H_S</i>	Nei's 基因 分化系数 <i>G_{st}</i>
6 个居群 Six populations			
平均 Mean	0.1248	0.0793	0.3646
标准差 Standard deviation	0.0333	0.0143	

* *H_T*, total gene diversity; *H_S*, gene diversity within population; *G_{st}*, the coefficient of gene differentiation

表 4 6 个居群的 Nei's 遗传一致度(右上角)和 Nei's 遗传距离(左下角)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) for six populations

居群 Population	DF	CH	LK	CK	FD	JS
DF		* * * * 0.9496	0.9251	0.9517	0.9197	0.9284
CH	0.0517		* * * * 0.9236	0.9323	0.9239	0.9270
LK	0.0778	0.0795		* * * * 0.9721	0.9453	0.9344
CK	0.0495	0.0701	0.0283		* * * * 0.9460	0.9502
FD	0.0837	0.0792	0.0563	0.0555		* * * *
JS	0.0743	0.0758	0.0678	0.0511	0.0178	

1. 1299, 基因多样性(H_E)为 0.0793, Shannon 多态性信息指数(H)为 0.1201, 远低于近缘种樟科植物油丹(*Alseodaphne hainanensis*)居群 RAPD 遗传多样性水平* ($PPL=53.85\%$, $A_e=1.3270$, $H_E=0.1894$, $H=0.2820$), 与 Frankham (1997)^[20]的综述结论相似。同样基于 RAPD 位点分析, 夏威夷群岛特有木本植物 *Colubrina oppositifolia*、*Alphitonia ponderosa* 的居群遗传多样性(H_E)分别为 0.1360、0.0845^[21], 均高于舟山新木姜子。卡拉里群岛 69 种特有植物的 Nei's 总基因多样性(H_T)的变化范围为 0.000~0.456, 平均值为 0.186^[22], 高于舟山新木姜子的 Nei's 总基因多样性($H_T=0.1248$)。但在 DeJooede 和 Wendel(1992)^[23]的综述中, 海洋岛屿植物的总基因多样性明显偏低($H_T=0.064$), 这可能与岛屿选择及物种选择的范围有关^[22]。

因此根据 RAPD 位点分析比较, 可以判断岛屿植物舟山新木姜子具有中等偏低水平的遗传多样性。对于岛屿定居物种, 繁育特性与散布能力、有效居群大小等对岛屿居群遗传多样性具有重要影响^[20,24]。Hamrick 等^[25]发现雌雄异株、虫媒花类居群的平均多态位点百分比($PPL=35.9\%$)高于杂性花类($PPL=29.2\%$)及自花授粉类($PPL=20\%$)。舟山新木姜子为典型的雌雄异株、虫媒传粉植物, 但居群 PAPD 多态位点百分比($PPL=23.18\%$)明显低于 35.9%, 并且 Nei's 总基因多样性($H_T=0.1248$)低于虫媒传粉植物的平均值($H_T=0.2019$)^[25]。舟山新木姜子花径小, 以小型昆虫为主要传粉媒介^[26], 由于岛屿海风频繁, 昆虫多以群聚方式生活, 活动范围很小, 花粉传播距离较为局限, 不利于基因交流与等位基因的随机固定, 居群有效扩张受到限制^[27~29]。

种子作为基因流的另一重要载体, 其有效传播对居群自然更新与扩展、以及居群遗传多样性同样具有重要影响^[29,30]。舟山群岛的舟山新木姜子雌株数量较多, 但由于受到昆虫传粉行为的影响, 结实量明显降低; 岛屿鸟类受人为干扰而日渐稀少, 进一步限制了种子流传播的频率及范围; 当地居民对种子及林下幼苗的采摘与移植, 严重影响了岛屿居群的自然更新与有效居群大小。目前整个群岛舟山新木姜子成年母株的数量甚至低于 100 株(>30a)。在卡拉里群岛 22 例特有植物基因多样性比较中^[22], 具有较大居群(个体株数>2500)的岛屿物种平均基因多样性($H_E=0.1460$)显著高于具较小居群(个体株数<100)的岛屿物种($H_E=0.0970$), 而舟山新木姜子居群基因多样性(H_E)仅为 0.0793, 说明居群大小对舟山新木姜子的遗传多样性已造成严重影响。普陀山岛($H_E=0.0703$)、朱家尖居群($H_E=0.0646$)的遗传多样性明显低于大猫岛(冷坑居群 H_E 为 0.0956, 长坑居群 H_E 为 0.0929)及桃花岛(茶山岙居群 H_E 为 0.0803, 大佛岩居群 H_E 为 0.0718)则进一步证实了人为干扰是岛屿居群衰退、遗传多样性丧失的主导因素^[22,31,32]。

万方数据

* 卓元午. 两个海南特有种的遗传多样性. 南京大学硕士学位论文. 2003.

表 5 4 个岛屿居群的地理距离(右上角)与 Nei's 遗传距离(左下角)
Table 5 Geographical distance (Km, above diagonal) and genetic distance (below diagonal) for four island populations

居群 Population	TH	DM	PT	ZJ
TH	* * * *	13	18	9
DM	0.0422	* * * *	16	11
PT	0.0667	0.0503	* * * *	4
ZJ	0.0582	0.0492	0.0178	* * * *

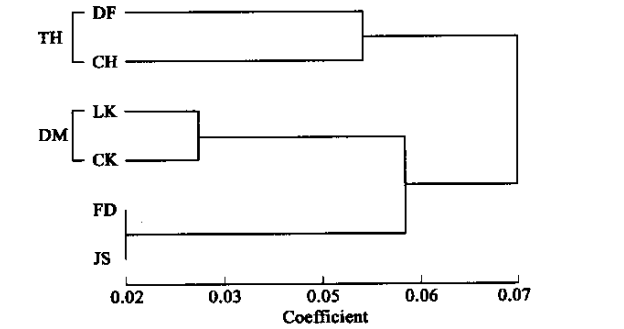


图 3 舟山新木姜子居群 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图
Fig. 3 UPGMA dendrogram for six populations of *Neolitsea sericea* based on Nei's genetic distance

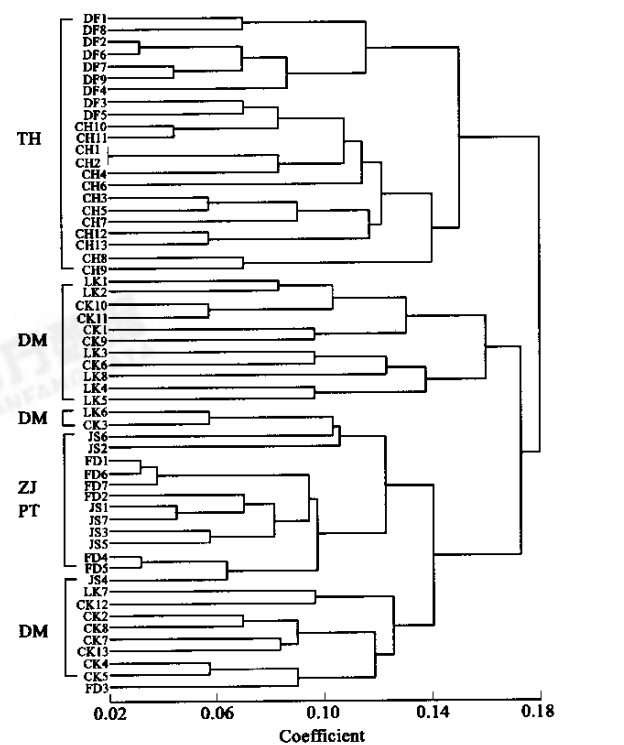


图 4 舟山新木姜子单株间的 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类图
Fig. 4 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance of the fifty-seven individuals of *Neolitsea sericea*

4.2 舟山新木姜子居群间的遗传分化

分析居群遗传多样性的分布,有助于理解物种整体水平遗传变异分布的空间格局,尤其对于濒危、特有物种保护措施制定具有重要指导意义^[28]。基因流受阻、遗传漂变以及近交等被认为是导致居群间遗传分化的主要原因^[30,33,34]。岛屿物种因其具有地理隔离、分布范围狭窄以及居群规模较小等特点已成为居群遗传分化研究的模式物种^[22,35]。

在卡拉里群岛,23 例特有植物居群间遗传分化系数(G_{st})的变化范围为 0.0~77.3%,平均值为 28.06%^[22],低于舟山新木姜子居群间的遗传分化系数($G_{st}=36.46\%$),表明舟山新木姜子居群间遗传分化程度较高,接近于夏威夷群岛特有木本植物 *C. oppositifolia*、*A. ponderosa* 的居群间遗传分化水平(G_{st} 分别为 37.5%、38.1%)^[21]。Kwon 等^[21]认为岛屿间地理隔离限制了花粉及种子传播者的有效散布范围,在 *A. ponderosa* 居群内甚至出现了近交,而人为干扰导致部分种子传播者(如乌鸦等)的灭绝进一步加剧了居群间的分化,洋流漂浮则成为岛屿间种子交流的主要方式。舟山新木姜子传粉者为小型昆虫^[26],根本无法逾越海域障碍而进行岛屿间花粉传播;鸟类对舟山新木姜子种子的传播行为由于受到种子大小、一次捕食量以及种子消化、排泄等因素的限制,最大传播范围仅为 480~680m^[36],而大猫岛、桃花岛、普陀山岛、朱家尖岛之间的最短海域距离为 4000m。岛屿地理隔离成为舟山新木姜子居群间花粉及种子散布的最大阻碍,导致居群间存在较高度度的遗传分化,地理距离与遗传距离之间存在显著的相关性($r=0.7697, P=96.62\%$)

相对于不同岛屿居群间较高的遗传分化程度,岛屿内居群遗传变异的分布呈随机嵌块式样,与分布生境、地理间隔无显著相关性^[22],在聚类分析中,岛屿内个体常聚为一个分支,可能与岛屿范围较小、岛屿物种生境单一以及居群间基因流较强有关^[35~37]。在舟山新木姜子居群 UPGMA 聚类图中(图 3),大猫岛冷坑(LK)、长坑(CK)居群以及桃花岛茶山岙(CH)、大佛岩(DF)居群分别构为一个分支。在单株 UPGMA 聚类图中(图 4)桃花岛大佛岩居群(DF)与茶山岙居群(CH)的所有个体构为一个分支,说明岛屿内基因交流相对频繁,居群间分化程度较低。在 Keojae 岛屿上,舟山新木姜子 5 个居群间的遗传分化系数 G_{st} 仅为 0.012, Moran's I 分析表明居群间遗传变异为均质分布,遗传结构非常相似,存在较强的基因流^[36]。

大猫岛居群的部分个体与普陀山岛、朱家尖岛个体聚为一支,基于大猫岛成年株数最多、遗传多样性水平最高的结论,可以推测普陀山岛、朱家尖岛的部分个体可能为大猫岛迁入的后裔。而普陀山岛、朱家尖岛居群内的个体在聚类图中表现出密切的缘关系,构成一大分支,并且居群遗传多样性水平非常接近,居群间遗传距离($D=0.0178$)甚至低于同一岛屿内居群间的遗传距离(大猫岛 2 个居群间遗传距离 D 为 0.0283),可以判断朱家尖岛舟山新木姜子经由人为移植自普陀山岛,与当地居民的推测相符。

4.3 岛屿植物多样性保护

岛屿具有丰富的植物多样性,但岛屿居群较陆地居群具有更高的灭绝风险^[20,38,39]。自 17 世纪至 20 世纪地球上灭绝的维管植物共计 384 种,其中岛屿植物 139 种,约占 36%^[40],IUCN(the International Union for Nature Conservation)收录的濒危植物中约 33.3% 为岛屿特有植物,如卡拉里群岛 20% 特有植物处于濒危状态^[22]。过度砍伐、生境破坏、外来种引入等人干扰被认为是导致岛屿物种濒危或灭绝的主要原因^[3,20,31,39],表现为有效居群衰退、近交频度增加、遗传多样性丧失、适合度降低以及适应与竞争能力下降等^[20,41,42]。

RAPD 分析表明舟山新木姜子自然居群遗传多样性水平偏低($PPL=23.18\%, H_E=0.0793, H=0.1201$),相对于花粉及种子传播的局限性,人为干扰是导致舟山新木姜子居群萎缩、遗传多样性降低的直接原因,而岛屿地理隔离进一步限制居群间的基因交流,加剧了居群间遗传分化($G_{st}=36.46\%$)。因此基于舟山新木姜子的物种保护与资源利用,建议加强现有自然居群的就地保护,控制采种行为,杜绝林下幼苗挖掘,以促进居群的自然更新和繁衍;在舟山岛建立种质资源库,并将大猫岛、桃花岛、普陀山岛等岛屿的个体进行混合繁殖,促进居群间基因交流,最大限度保护舟山新木姜子的遗传多样性;在原地居群保护及异地培育的基础上,选育优良品种用于海岛植被恢复及园林观赏。

References:

[1] Quammen D. *The song of dodo, Island biogeography in an age of extinction*. London: Touchstone Books, 1996.

[2] Grant P R. *Evolution on islands*. Oxford: Oxford University Press, 1998.

[3] Stuessy T F, Ono M. *Evolution and speciation of island plants*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

[4] Emerson B C. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Molecular Ecology*. 2002, **11**:951~966.

[5] MacArthur R H, Wilson O E. An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*. 1963, **37**:373~387.

[6] MacArthur R H, Wilson O E. *The theory of island geography*. Princeton: Princeton Press, 1967.

[7] Losos J B, Schluter D. Analysis of an evolutionary species—area relationship. *Nature*. 2000, **408** (6814): 847~850.

- [8] Johnson K P, Adler F R, Cherry J L. Genetic and phylogenetic consequences of island biogeography. *Evolution*, 2000, **54** (2): 387~396.
- [9] Cherry J L, Adler F R, Johnson K P. Islands, equilibria, and speciation. *Science*, 2002, **296** (5570): 1~1.
- [10] Lawesson J E, Adersen H, Bentley P. *An undated and annotated check list of the vascular plants of the Galapagos Islands*. Denmark: Botanical Institute, University of Aarhus, Aarhus, 1987.
- [11] Avise J C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [12] Wu Z Y. *Vegetation of China*. Beijing: Science Press, 1980.
- [13] Jin P Y, Chen Q H, Zhang X H, Li G Y, Zhang R H. Research on the regional botanical system in Zhoushan Islands. *Journal of Zhejiang Forest and Technology*, 1991, **11**(3):1~30.
- [14] Wang G M, Xu S H, Ye Z J, *et al.* Distribution and protection of rare plants in Zhoushan Islands. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 1998, **15**(2):181~186.
- [15] Ding F M, Zhang C B, Lu X G. Investigation report on *Neolitsea sericea* resources in Zhoushan. *Journal of Zhejiang Forest and Technology*, 2001, **21**(4):52~54.
- [16] Doyle J J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation. In Hewitt G. M. and Johnston A. Eds. *Molecular techniques in taxonomy*. Berlin, : Springer-Verlag, 1991. 283~293.
- [17] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, *et al.* POPGENE, *the user friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada, 1997.
- [18] Rohlf F J. NTSYS-PC. *Version 2.10*. New York: Appllied Biostatistics Inc. , 1994.
- [19] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, **89**: 583~590.
- [20] Frankham R. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, 1997, **78**:311~327.
- [21] Kwon J A, Morden C W. Population genetic structure of two rare tree species (*Colubrina oppositifolia* and *Alphitonia ponderosa*, Rhamnaceae) from Hawaiian dry and mesic forests using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Ecology*, 2002, **11**:991~1001.
- [22] Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Kim S C, *et al.* Plant genetic diversity in the Canary Islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany*, 2000, **87**(7):909~919.
- [23] Dejoode D E, Wendel J. Genetic diversity and origin of the Hawaiian Islands cotton, *Gossypium tomentosum*. *American Journal of Botany*, 1992, **79**:1311~1319.
- [24] Weller S G, Sakai A K, Straub C. Allozyme diversity and genetic identity in *Schiedea* and *Alsiniidendron* (Caryophyllaceae:Alsinoideae) in the Hawaiian Islands. *Evolution*, 1996, **50**:23~34.
- [25] Hamrick J L, Gold M J W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A. H. D and Clegg M. T. eds. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Massachusetts: Sinauer Press. 1990.
- [26] Yumoto T. Pollination systems of a warm temperature evergreen broad-leaved forest in Yakushima Island. *Ecological Research*, 1987, **2**: 133~145.
- [27] Hamrick J L, Nason J D. Consequences of dispersal in plants. In: Rhodes O E, Chesser R, Smith M. eds. *Spatial and temporal aspects of population processes*. Chicago: University of Chicago Press, 1996.
- [28] Hamrick L K, Godt M J W, Murowski D A, Loveless M D. Conservation genetics of endemic plant species. In Avise J. C. and Holsinger K. E. eds. *Conservation genetics-case studies from nature*. New York: Chapman and Hall, 1996.
- [29] Hamilton M B, Miller J R. Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics*, 2002, **162**(4):1897~1909.
- [30] Ouborg N J. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*, 1999, **87**:551~568.
- [31] Olson S L. Extinction on islands. In Western D. and Pearl M. eds. *Conservation for the twenty-first century*. Oxford: Oxford Nniversity Press, 1989.
- [32] Gray A. Genetic diversity and its conservation in natural populations of plants. *Biodiversity letters*, 1996, **3**:71~80.
- [33] Starkin M. Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science*, 1987, **236**:787~792.
- [34] Manel S. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in ecology and evolution*, 2003, **18**(4):189~197.
- [35] Carlos J, Emerson BC, Oromi P, *et al.* Colonization and diversification: towards a phylogeographics synthesis for the Canary Islands. *Tree*, 2000, **15**:104~109.
- [36] Chung G C, Chung M Y, Oh G S, *et al.* Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* population (Lauraceae). *Heredity*, 2002, **85**:490

~497.

[37] Sahuquillo E, Lumaret R. Variation in the subtropical group *Dactylis glomerata* L. 1. evidence from allozyme polymorphism. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1995, **23**:407~418.

[38] Rieseberg L H, Swensen S M. Conservation genetics of endangered island plants. In: Avice J C, Hamrick J L eds. *Conservation genetics: case histories from nature*. New York: Chapman and Hall, 1996.

[39] Raven P H. Plant conservation in a changing world. *Aliso*, 1998, **16**:121~126.

[40] Reid W V, Miller K R. *Keeping Options Alive: The Scientific Basis for Conserving Biodiversity*. World Resources Institute. Washington, DC. , 1989.

[41] Ferson S, Burgman M A. Correlations, dependency bounds, and extinction risks. *Biological Conservation*, 1995, **73**:101~105.

[42] Mengens E. Evaluating extinction risks in plant populations. In: Fiedler P L, Kareiva P M eds. *Conservation biology: for the coming decade* (2nd ed.). New York: Chapman and Hall, 1998.

参考文献:

[12] 吴征溢. 中国植被. 北京:科学出版社, 1980.

[13] 金佩聿, 陈翔虎, 张晓华, 等. 舟山群岛植物区系的研究. 浙江林业科技, 1991, **11**(3):1~30.

[14] 王国明, 徐树华, 叶志军, 等. 舟山群岛珍稀濒危植物的分布与保护. 浙江林学院学报, 1998, **15**(2):181~186.

[15] 丁方明, 张成标, 卢小根. 舟山新木姜子资源调查报告. 浙江林业科技, 2001, **21**(4):52~55.

