

海南岛红树植物海桑遗传多样性的 ISSR 分析

李海生^{1,2}, 陈桂珠^{1*}

(1. 中山大学环境科学研究所, 广州 510275; 2. 广东教育学院生物系, 广州 510310)

摘要:海桑(*Sonneratia caseolaris*)是海桑科红树植物,在我国仅天然分布于海南万宁、琼海、文昌等地。采用 ISSR 分子标记技术对所有天然种群和海南东寨港红树林自然保护区引种的人工种群共 4 个种群 86 个个体进行了遗传变异分析。11 个引物共扩增出 239 条带,其中 194 条具多态性,多态位点百分率为 81.17%。在种群水平上多态位点百分率 40.59%~50.21%,平均值为 45.71%。Nei 的基因多样性、Shannon 信息指数在物种水平上分别为 0.2100 和 0.3256,在种群水平上平均值分别为 0.1468 和 0.2210。Nei 的遗传分化系数 G_{ST} 和 AMOVA 分析表明种群间已发生了较高的遗传分化。种群间的遗传一致度为 0.9011。估测的种群间的基因流为 0.5787。依据 Nei 的遗传距离对不同种群进行 UPGMA 聚类,聚类结果为横山种群(HS)和东寨港种群(DZG)聚在一起,万宁种群(WN)和琼海种群(QH)聚为一类。Mantel 检验表明遗传距离与地理距离之间有一定的正相关,但不显著。种群遗传多样性与环境因子间的相关性分析表明:海桑种群遗传多样性水平与各环境因子间相关性均不显著。因东寨港引种种群的遗传多样性明显低于天然种群,为保护遗传多样性,应加强对琼海、万宁种群的就地保护和迁地保护工作。

关键词:海桑;遗传多样性;ISSR;环境因子;保护

Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan Island based on ISSR analysis

LI Hai-Sheng^{1,2}, CHEN Gui-Zhu¹ (1. Institute of Environmental Sciences, Sun Yatsen University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Biology, Guangdong Education Institute, Guangzhou 510310, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(8): 1656~1662.

Abstract: *Sonneratia caseolaris* is a mangrove species belonging to Sonneratiaceae. The natural distribution in China restricted to Hainan Island. Sample leaves were collected from individuals of three natural *S. caseolaris* populations of Wanning (WN), Qionghai (QH) and Hengshan (HS) and one population at Dongzhai Harbor (DZG) introduced from nearby area. A total of eighty-six individuals were sampled. Eleven ISSR primers gave rise to 239 discernible DNA fragments of which 194 (81.17%) were polymorphic. The percentage of polymorphic bands at the population level ranged from 40.59% to 50.21%, with average of 45.71%. The Nei's genetic and Shannon's information index were 0.2103 and 0.3256 respectively at the species level, 0.1468 and 0.2210 respectively at the population level. Based on Nei's G_{ST} value and analysis of molecular variance (AMOVA), it showed that higher genetic differentiation had occurred among populations. The genetic identity between populations was 0.9011 on average. Gene flow (N_m) was 0.5787. UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distance divided the populations into two main groups: WN and QH formed one group, while HS and DZG formed the other group. The Mantel test showed that genetic distance was positively correlated with geographical distance, but not significant. The correlation analysis showed that there was no significant relation between population genetic diversity level and environmental factors. Since the genetic diversity of DZG was obviously lower than that of natural populations, the effort of *in situ* and *ex situ* protection to QH and WN should be strengthened to conserve genetic diversity.

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20010558004)

收稿日期:2004-04-22; **修订日期:**2004-07-11

作者简介:李海生(1971~),男,河南沁阳人,博士,讲师,主要从事植物学、生态学和保护生物学研究。E-mail: lhs11@gdei.edu.cn

* **通讯作者** Author for correspondence, E-mail: chengguizhu@yeah.net

致谢:本研究野外采样得到了东寨港自然保护区陈建海、钟才荣等同志的帮助,实验在中山大学教育部基因工程重点实验室完成,实验过程中一直得到施苏华教授的关心和指导,在此深表谢意

Foundation item: Grants from the National Ministry of Education Foundation for Ph.D. program (No. 20010558004)

Received date: 2004-04-22 **Accepted date:** 2004-07-11

Biography: LI Hai-Sheng, Ph.D., Lecturer, mainly engaged in botany, ecology and conservation biology. E-mail: lhs11@gdei.edu.cn

Key words: *Sonneratia caseolaris*; genetic diversity; ISSR; environmental factors; conservation

文章编号:1000-0933(2004)08-1656-07 中图分类号:Q948.1,Q16 文献标识码:A

海桑(*Sonneratia caseolaris* (L.) Engler)是海桑科海桑属植物,主要分布于热带亚洲东南部海岸、澳大利亚北部和西太平洋所罗门群岛^[1],在我国仅天然分布于海南的文昌、琼海、万宁等地海岸,是热带和亚热带海岸红树林群落乔木层基本组成种类,在我国红树林植物中占有重要地位。海桑树体高大,具有生长迅速、多笋状呼吸根等特点,对防风防浪、促淤造陆有显著效果,其果实酸甜可食,亦可作为提取果胶的原料^[2]。20 世纪 80 年代成功地将海桑从文昌引种于海南东寨港,海桑作为沿海滩涂生态恢复和海岸绿化的优良树种之一,目前已广泛引种于广东、广西沿海滩涂。对海桑的形态、解剖、生理生态、育苗技术等领域进行了较广泛的研究^[3~8],但迄今有关海桑遗传多样性的研究仍未见报道。

ISSR(inter-simple sequence repeat)标记是 Zietkiewicz^[9]等于 1994 年创建,建立在 PCR 反应基础上的一种新型的分子标记技术。ISSR 标记结合了 SSR 和 RAPD 的优点,具有模板需要量少,多态性丰富,无需试剂盒,结果记录方便,实验成本低,操作简单,实验稳定性较高等优点,现已成功地用于许多栽培种和野生种的遗传多样性研究^[10~15]。本研究采用 ISSR 分子标记来研究海桑的遗传变异,以阐明其遗传多样性水平和遗传结构,为有效保护海桑遗传资源提供基础资料和科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料 在海桑的分布区内,对所有天然种群包括万宁石梅港(简称万宁种群,WN)、琼海福田镇新潮村(简称琼海种群,QH)、文昌横山村(简称横山种群,HS)种群进行了采样。对东寨港红树林自然保护区从文昌引种的海桑种群(简称东寨港种群,DZG)亦作了取样分析。采样时采摘海桑的嫩叶,置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存。同时采集各种群距地表 0~20 cm 深处的土壤,供土壤分析用。采样时间为 2001 年 12 月。各种群的基本情况及其环境因子测定结果见表 1。

1.2 研究方法

1.2.1 植物基因组 DNA 提取 采用 CTAB 法^[16]提取基因组 DNA,用电泳法测其含量。

1.2.2 PCR 扩增 对购自于哥伦比亚大学的 100 个引物(UBC set No. 9)进行了筛选,从中选取扩增条带清晰,重复性较好的 11 个引物(表 2)用于 PCR 扩增。扩增反应在 PTC-100 型 PCR 仪上进行。经实验证实较好的扩增条件为每 10 μ l 反应体积分含 1 μ l 10 $\times$ buffer(100 mmol/L KCl, 80 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 0.5% NP-40), 2~3.75 mmol/L Mg²⁺(随引物而不同)(表 2), 300 μ mol/L dNTPs, 0.3 μ mmol/L primer, 0.35 U Taq DNA 聚合酶(上海申能博彩生物科技有限公司),10 ng 模板 DNA。扩增程序:94 C 预变性 5 min,之后进行 45 个循环,每个循环包括 94 C 变性 45 s,52~53.5 C 退火(退火温度随引物而定)(表 2)45 s,72 C 延伸 1.5 min,最后于 72 C 延伸 7 min。将扩增产物置于 4 C 冰箱保存。

表 1 海桑取样种群的基本情况

Table 1 The general situation of *Sonneratia caseolaris* sampling populations

项目 Item	WN	QH	HS	DZG
取样数 Number of samples	22	20	22	22
经度 Longitude	110°10'35"	110°36'16"	110°45'54"	110°35'11"
纬度 Latitude	18°35'57"	19°13'58"	19°37'47"	19°57'11"
降雨量 Precipitation (mm)	1883.8	2072	1974	1676.4
总氮 Total nitrogen (g/kg)	0.969	1.179	0.852	0.373
总磷 Total phosphorous (g/kg)	0.291	0.411	0.149	0.384
总钾 Total potassium (g/kg)	2.577	2.240	1.750	3.815
有效氮 Extractable nitrogen(mg/kg)	160.86	95.51	75.95	44.35
有效磷 Extractable phosphorous (mg/kg)	14.69	38.34	4.89	4.63
有机质 Organic matter (g/kg)	56.671	32.017	26.075	18.322
含盐量 Salt (%)	1.881	1.304	1.040	1.053
pH 值 pH value	3.23	3.76	6.78	5.18
电导率 Soil conductivity (ms/cm)	4.1	3.2	3.9	3.2

1.2.3 PCR 产物鉴定 将 PCR 扩增产物在用 0.5 $\times$ TBE 配制的含有 EB 的 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳分离,以 100 bp DNA ladder (100~3000 bp) 作为相对分子质量标准,在 60 mA 的恒流下电泳 3 h。电泳结束后在紫外检测仪上观察记录扩增产物的泳带,并在凝胶成像系统中保存图像。

1.2.4 数据的统计和分析

(1)种群遗传多样性及遗传结构分析 在琼脂糖凝胶电泳图谱上同一 ISSR 位点上有电泳带记为 1,无电泳带的记为 0。作 0,1 矩阵输入计算机。应用 POPGENE 程序,假定种群在这些 ISSR 标记位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,统计下列参数:

(1)多态位点百分数(*PPB*):扩增的 DNA 片段出现频率小于或等于 0.99 的位点即为多态位点,多态位点百分数 = 具有多态的位点数/检测到的位点数 $\times 100\%$;(2)平均每个位点的观察等位基因数(*Na*);(3)平均每个位点的有效等位基因数(*Ne*);(4) Nei 的基因多样性(*h*)^[18];(5)Shannon 信息指数(*I*);(6) 总的基因多样性度(*Ht*)和种群内的基因多样性度(*Hs*);(7)基因分化系数(*Gst*)和基因流(*Nm*);(8)Nei 的遗传距离(*D*)^[19]和遗传一致度(*I*)。本研究对群体的遗传结构还进行了 AMOVA 分析,以与 Nei 的遗传多样性分析结果进行比较,应用软件为 Amova 1.55^[20]。

(2)聚类分析 采用算数平均数的非加权成组配对法(unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA)对种群间使用 Nei 的遗传距离进行聚类分析。使用软件为 NTSYSpc 2.02^[21]。

(3)相关性分析 应用 NTSYSpc 2.02 软件的 Mantel 统计学检验,进行种群间地理距离和遗传距离之间的相关性分析,并作显著性检测(1000 次置换)。种群的遗传多样性水平与环境因子间的关系,由 SPSS 11.0 软件得出。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 扩增结果

用 11 个 ISSR 引物扩增了 4 个海桑种群共 86 个个体,共扩增出 239 条带,其中 194 条具多态性,多态位点百分率为 81.17%。每个引物扩增的条带数为 12~30 条,平均每个引物扩增的条带数为 21.7 条(表 3),扩增的条带在 180 bp 至 2700 bp 之间。其中引物 857 对文昌横山种群(HS) 22 个个体的扩增结果见图 1。ISSR-PCR 扩增结果共检测出 86 个基因型,即每个样品均有独立的基因型。

2.2 海桑的遗传多样性分析

海桑种群内的多态位点百分率在 40.59%~50.21%之间,平均值为 45.71% $\pm$ 5.00%。每位点的平均有效等位基因数为 1.3475。Nei 的基因多样性在种群水平上为 0.1315~0.1666 之间,平均值为 0.1468,在物种水平上为 0.2100;Shannon 信息指数在种群水平上为 0.1974~0.2496 之间,平均值为 0.2210,在物种水平上为 0.3256。4 个种群中,来自于琼海种群(QH)和文昌横山种群(HS)表现出较高的遗传多样性,来自于万宁种群(WN)和东寨港引种栽培的种群(DZG)表现出较低的遗传多样性水平(表 4)。

2.3 海桑的遗传结构与聚类分析

由 POPGENE 分析,海桑所有群体的基因多样性(*Ht*)为 0.2103,种群内的基因多样性度(*Hs*)为 0.1468,种群间基因多样性度为 0.0635,遗传分化系数(*Gst*)为 0.3017,种群间基因流(*Nm*)的估测值为每代群体间平均为 0.5787 个个体。由此表明,分布在种群间的遗传变异占总遗传变异的 30.17%,分布在种群内个体间的遗传变异占 69.83%。与 Nei 的遗传多样性分析所得到的遗传分化系数(*Gst*)相比,AMOVA 分析结果得出更高的群体遗传分化:在总的遗传变异中有 40.11%的变异发生在群体间,有 59.89%的变异发生在群体内,群体间和群体内变异均极显著($P<0.001$)(表 5)。由表 6,种群间遗传一致度 *I* 值的变化范围为 0.8419~0.9412,所有群体间的平均一致度 0.9011 $\pm$ 0.0376。根据 Nei 的遗传距离将所有群体进行 UPGMA 聚类,得树状图(图 2)。聚类结果为横山种群(HS)和东寨港种群(DZG)聚在一起,万宁种群(WN)和琼海种群(QH)聚为一起。为了检测种群遗传分化与种群间地理距离之间的相关性,利用 Mantel 检验分析了种群间 Nei 的遗传距离矩阵与种群间地理矩阵之间的相关性。检验结果表明,遗传距离与地理距离之间呈一定的正相关,但相关性未达显著水平($r=0.7639$,平方数据 >0.05)。

表 2 对海桑进行 ISSR 扩增的引物、序列、Mg²⁺ 浓度及退火温度
Table 2 Primers used for ISSR amplification, sequence, concentration of Mg²⁺ and annealing temperature

引物 Primer	引物序列 Sequence of primer	Mg ²⁺ (mmol/L)	退火温度(℃) Annealing temperature
808	(AG) ₈ C	3.25	53.5
809	(AG) ₈ G	2	52
835	(AG) ₈ (CT)C	3.75	53.5
836	(AG) ₈ (CT)A	2	52
840	(GA) ₈ (CT)T	3.75	53
842	(GA) ₈ (CT)G	3.75	53
847	(CA) ₈ (AG)C	2	53.5
857	(AC) ₈ (CT)G	2	52
864	(ATG) ₆	3.75	53.5
868	(GAA) ₆	2	52.5
887	(AGT)(ACG)(AGT)(TC) ₇	3.75	52

表 3 ISSR 扩增的条带数
Table 3 Number of band loci for ISSR primers

引物 Primer	总条带数 Total bands	多态带数 Polymorphic bands	多态带百分率(%) Percentage of polymorphic bands
808	17	12	70.59
809	21	20	95.24
835	12	8	66.67
836	24	17	70.83
840	20	17	85.00
842	30	26	86.67
847	22	20	90.91
857	27	25	92.59
864	17	11	64.71
868	24	18	75.00
887	25	20	80.00
平均 Average	21.7 $\pm$ 5.1	17.6 $\pm$ 5.6	79.84 $\pm$ 10.90
总群体 All locus	239	194	81.17

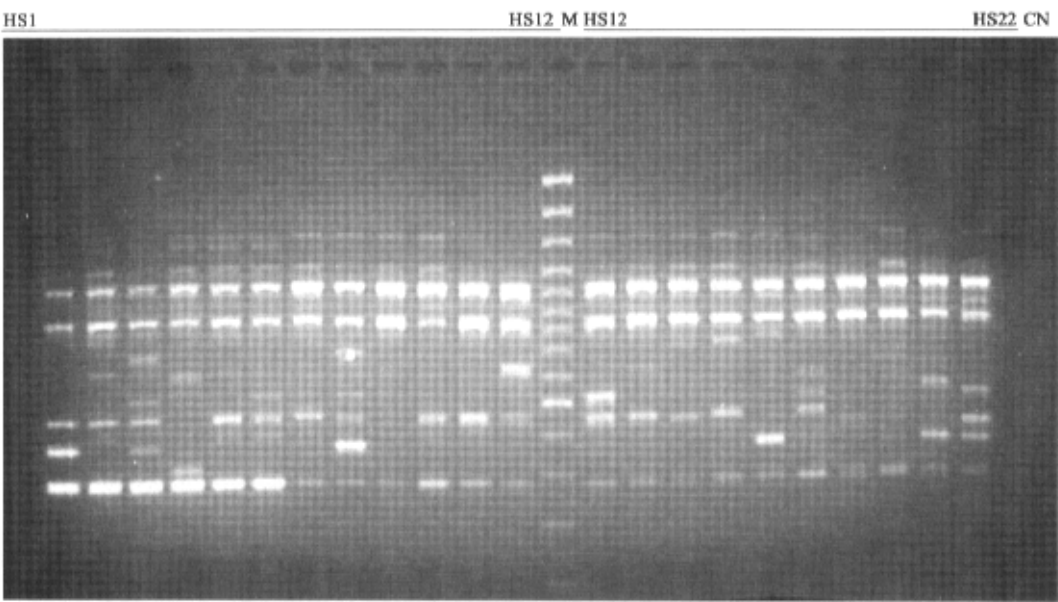


图 1 引物 857 对文昌横山种群(HS)22 个样品的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 1 ISSR- PCR fingerprints of 22 samples of *Sonneratia caseolaris* from HS population using primer 857

M 为 100 bp DNA 分子量标准 Marker,CN 为负对照 M: 100 bp DNA ladder. CN: Negative control

表 4 海桑种群间遗传变异统计

Table 4 The genetic variation statistics among populations of *Sonneratia caseolaris*

种群 Population	观察等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Nei 的基因 多样性 h	Shannon 信息 指数 I	多态位点百分数 PPB
WN	1. 4226±0. 4950	1. 2330±0. 33534	0. 1351±0. 1906	0. 2031±0. 2732	42. 26
QH	1. 5021±0. 5010	1. 2880±0. 3732	0. 1666±0. 1997	0. 2496±0. 2848	50. 21
HS	1. 4979±0. 5010	1. 2607±0. 3524	0. 1541±0. 1914	0. 2339±0. 2747	49. 79
DZG	1. 4059±0. 4921	1. 2254±0. 3443	0. 1315±0. 1889	0. 1974±0. 2719	40. 59
平均 Average	1. 4571±0. 0500	1. 2518±0. 0285	0. 1468±0. 0165	0. 2210±0. 0249	45. 71±5. 00
总群体 All locus	1. 8117±0. 3918	1. 3475±0. 3550	0. 2100±0. 1851	0. 3256±0. 2569	81. 17

N_a Observed number of alleles; N_e Effective number of alleles; h Nei's gene diversity; I Shannon's information index; PPB The percentage of polymorphic bands

2. 4 海桑种群遗传多样性与环境因子间相关性分析

利用 SPSS11. 0 软件将 4 个种群的遗传多样性指标,包括等位基因数(N_a),有效等位基因数(N_e),Nei 的基因多样性(h),Shannon 信息指数(I)和多态位点百分数(PPB)与各环境因子间作相关性分析,结果见表 7。结果表明:海桑种群遗传多样性水平与降雨量、土壤总氮量、有效磷含量有一定的正相关,与土壤总钾含量有一定的负相关,但相关性均不显著。

表 5 海桑种群内和种群间分子变异的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) within /among *Sonneratia caseolaris* populations

变异来源 Source of variation	自由度 $d. f.$	方差和 SSD	平均方差 MSD	变异组分 Variance component	总变异 Total variance(%)	P^*
种群间 Among populations	3	723. 17	241. 055	10. 489	40. 11	<0. 001
种群内 Within populations	82	1284. 51	15. 665	15. 665	59. 89	<0. 001

$d. f.$, Degree of freedom; SSD, Sum of squared deviations; MSD, Mean squared deviations. * Significance tests after 1000 permutations

3 讨论

3. 1 海桑的遗传多样性

从研究结果来看,海桑在物种水平上总的基因多样性(H_t)为 0. 2103,多态位点百分率(PPB)为 81. 17%,稍低于红树植物银叶树(*Heritiera littoralis*)的 ISSR 遗传多样性水平($H_t=0. 2327$, $PPB=83. 19\%$)^[22],但远高于红树植物桐花树(*Aegiceras*

corniculatum)、角果木(*Ceriops tagal*)的 ISSR 遗传多样性水平,这两种红树植物总的基因多样性(H_t)分别为 0.039 和 0.016,多态位点百分率(PPB)分别为 16.18%和 8.96%^[11,23],也高于同属植物卵叶海桑的 ISSR 遗传多样性水平($H_t=0.1380$, $PPB=68.65\%$)^[24]。因此,与上述红树植物相比,海桑的遗传多样性水平较高,这与大多数热带树种含有较高的遗传多样性水平相一致^[25]。海桑是广泛分布于热带、亚热带海岸潮间带的一种异交长寿多年生常绿木本植物,这样的生活史特征使海桑具有较高的遗传多样性水平。有研究表明:物种种群遗传多样性的高低与环境因子有关,如生境复杂程度^[26,27]、土壤^[28~30]等。但本研究并未发现海桑种群遗传多样性与各环境因子有显著的相关性,这可能是因为分子变异在时空上的分布不只受到环境的影响,还与物种的繁育系统、生活习性、种群大小等有关。

3.2 海桑的遗传结构

根据 G_{st} 和 AMOVA 分析结果,海桑种群间已发生了较高的遗传分化。这可能与种群间的地理隔离有关。种群间的遗传距离与地理距离呈一定的正相关,说明地理隔离对种群分化产生了影响。因地理隔离,造成种群间的基因流较低($N_m=0.5787$),从而造成了种群间较高的遗传分化。植物种群内和种群间的基因流是借助于花粉、种子、孢子、植株个体以及其他携有种群遗传物质的物体为媒介进行的,其中花粉和种子扩散是自然植物种群最主要的基因流。虽然海桑可以由昆虫、蝙蝠等帮助传粉,种子也可由涨潮、退潮的影响而被带往他处,但还没有信息表明海桑有远距离传播者。Wright 指出,如果 $N_m<1$,则由于遗传漂变可以导致种群间明显的遗传分化^[31]。从海桑属的演化及地史分布方面分析,海桑属是从早第三纪的始新世开始迅速演化和发展起来的亚洲属,可能起源于古老的特提斯海岸^[32]。华南沿岸第四纪孢粉研究表明,距今 3~4 万年,海桑属曾经广泛分布于雷州半岛、湛江地区、珠江三角洲和韩江三角洲等地,直到晚更新世末,由于受末次盛冰期气候变凉和南海海平面下降影响,海桑属从华南沿岸急剧消失,退缩到海南岛和中南半岛以南^[33]。据历史资料记载,海桑在海南岛的现存分布区域已大大缩小*,群体的不断缩小必然导致随机遗传漂变,从而造成种群间的明显分异。因此,基因流受阻、遗传漂变可能是导致海桑种群遗传分化的主要原因。

表 6 海桑种群间 Nei 的遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角)
Table 6 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of *S. caseolaris*

种群 Population	WN	QH	HS	DZG
WN	*	0.9393	0.8959	0.8419
QH	0.0626	*	0.9077	0.8808
HS	0.1100	0.0968	*	0.9412
DSG	0.1721	0.1269	0.0606	*

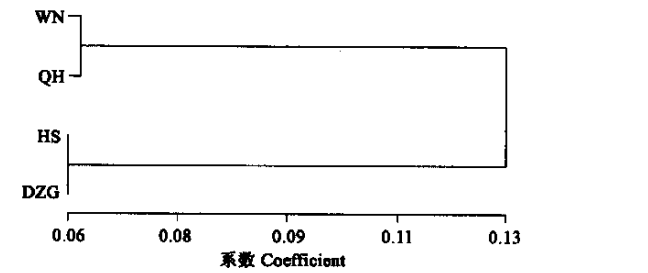


图 2 海桑各种群基于 Nei 的遗传距离的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Nei's genetic distance among populations of *Sonneratia caseolaris*

种群遗传物质的物体为媒介进行的,其中花粉和种子扩散是自然植物种群最主要的基因流。虽然海桑可以由昆虫、蝙蝠等帮助传粉,种子也可由涨潮、退潮的影响而被带往他处,但还没有信息表明海桑有远距离传播者。Wright 指出,如果 $N_m<1$,则由于遗传漂变可以导致种群间明显的遗传分化^[31]。从海桑属的演化及地史分布方面分析,海桑属是从早第三纪的始新世开始迅速演化和发展起来的亚洲属,可能起源于古老的特提斯海岸^[32]。华南沿岸第四纪孢粉研究表明,距今 3~4 万年,海桑属曾经广泛分布于雷州半岛、湛江地区、珠江三角洲和韩江三角洲等地,直到晚更新世末,由于受末次盛冰期气候变凉和南海海平面下降影响,海桑属从华南沿岸急剧消失,退缩到海南岛和中南半岛以南^[33]。据历史资料记载,海桑在海南岛的现存分布区域已大大缩小*,群体的不断缩小必然导致随机遗传漂变,从而造成种群间的明显分异。因此,基因流受阻、遗传漂变可能是导致海桑种群遗传分化的主要原因。

表 7 海桑种群遗传多样性与环境因子的相关性
Table 7 Correlation between population genetic diversity of *S. caseolaris* and environmental factors

环境因子 Environmental factor	等位基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Nei 的基因 多样性 h	Shannon 信息 指数 I	多态位点百分数 PPB
总氮 Total nitrogen	0.687	0.763	0.736	0.727	0.687
总磷 Total phosphorous	-0.291	0.062	-0.015	-0.067	-0.291
总钾 Total potassium	-0.850	-0.693	-0.726	-0.752	-0.850
有效氮 Extractable nitrogen	-0.059	-0.012	-0.051	-0.058	-0.059
有效磷 Extractable phosphorous	0.496	0.763	0.702	0.665	0.496
有机质 Organic matter	-0.158	-0.109	-0.149	-0.157	-0.158
含盐量 Salt	-0.302	-0.195	-0.248	-0.266	-0.302
pH 值 pH value	0.288	-0.004	0.082	0.126	0.288
电导率 Soil conductivity	-0.036	-0.265	-0.235	-0.202	-0.036
降雨量 Precipitation	0.9	0.907	0.906	0.908	0.9
经度 Longitude	0.591	0.463	0.520	0.542	0.591
纬度 Latitude	0.013	-0.071	-0.025	-0.012	0.013

N_a observed number of alleles; N_e effective number of alleles; h Nei's gene diversity; I Shannon's information index; PPB the percentage of polymorphic bands

3.3 海桑的保护

我国现存的海桑天然种群数量十分有限,天然分布区仅间断分布于海南岛东北部的万宁至文昌的沿海岸,目前成片分布区只见于万宁、琼海、文昌等地,总面积不超过 100 hm²。现有海桑天然林面积除了文昌有 70~90 hm² 外,其它地方分布面积都是很小的。保护物种,最主要的是保护其遗传多样性。物种遗传多样性的丰富程度决定了物种对环境的适应能力和进化潜力。从本研究结果来看,东寨港引种种群的遗传多样性明显低于天然种群。海桑目前被广泛引种种植,琼山东寨港保护区的海桑林是 20 世纪 80 年代初从文昌红树林保护区人工引进栽种的,现分布于湛江、雷州半岛、深圳等地的海桑林均是 20 世纪 80 年代末或 90 年代初从琼山东寨港自然保护区引进栽种的。从海桑遗传多样性来看,因都是直接或间接从文昌引种,对其遗传多样性保护不利。而且由于分布于万宁、琼海的海桑天然林面临人类搞水产养殖(挖虾塘、鱼塘等)而受到砍伐的严重威胁,如果不注意保护,分布于琼海、万宁的种群将会消失。因此为保护海桑的遗传多样性,应加强对琼海、万宁等天然种群的保护,而琼海种群其遗传多样性较其他种群高,具有丰富的基因资源,更应加以重点保护。除实施就地保护工作外,还应实施迁地保护工作。鉴于海桑种群间已发生较高的遗传分化,在实施迁地保护工作时,应在多个群体内取样,尤其是加强对琼海、万宁种群的采种、育苗工作,以全面保护海桑的遗传多样性。

References:

- [1] Tomlinson P B. *The botany of mangroves*. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 371~372.
- [2] Zhang F X, Liu M F. Studies on pectin from plants of *Sonneratia*. *Acta Bot. Austro. Sinica*, 1994, **9**: 116~119.
- [3] Chen Z L. The morphology and anatomy of *Sonneratia* Linn. f. in China. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 1996, **4** (2): 18~24.
- [4] Deng C Y, Lin Q X, Lin P, *et al.* Wood anatomy characteristics of 6 mangrove species of *Sonneratia* and their application. *Fujian Forestry Science and Technology*, 2000, **27** (3): 1~5.
- [5] Huang Q L, Huang Q C. The structure of vegetative organs and ecological adaptation of mangrove plants in China I. *Ecologic Science*, 1989, (1): 100~105.
- [6] Huang Q C, Huang Q L, Yang M L. The studies on the development, structure and ecological adaptation of aboveground root apices of the mangrove plants. *Acta Botanica Sinica*, 1994, **36** (8): 592~596.
- [7] Zan Q J, Wang B S, Wang Y J, *et al.* Ecological assessment on the introduced *Sonneratia caseolaris* and *S. apetala* at the mangrove forest of Shenzhen bay, China. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(5): 544~551.
- [8] Liao B W, Zhen D Z, Zhen S F, *et al.* The studies on seedling nursing techniques of *Sonneratia caseolaris* and its seedling growth rhythm. *Forest Research*, 1997, **10**(3): 296~302.
- [9] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, **20**: 176~183.
- [10] Esselman E J, Li J, Crawford D J, *et al.* Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecol.*, 1999, **8**: 443~451.
- [11] Ge X J, Sun M. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Mol. Ecol.*, 1999, **8**: 2061~2069.
- [12] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, **100**: 1050~1060.
- [13] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, **102**: 440~449.
- [14] Qi J M, Zhou D X, Wu W R, *et al.* Application of ISSR technology in genetic diversity detection of Jute. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, **14**(9): 1473~1477.
- [15] Ge Y Q, Qiu Y X, Ding B Y, *et al.* An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba*. *Biodiversity Science*, 2003, **11**(4): 276~287.
- [16] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987, **19**: 11~15.
- [17] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, *et al.* *POPGENE version 1.31*. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999. 万方数据
- [18] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**: 3321~3323.

[19] Nei M. Genetic distance between populations. *Amer Naturalist*, 1972, **106**: 283~292.

[20] Excoffier L. *Analysis of Molecular Variance. Version 1.55*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1993.

[21] Rohlf F J. *NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02*. Exeter Software, Setauket, New Youk, 1998.

[22] Jian S G, Shi S H, Zhong Y, *et al*. Genetic diversity among south China *Heritiera littoralis* detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis. *Journal of Genetics and Molecular Biology*, 2002, **13**(4): 272~276.

[23] Ge X J, Sun M. Population genetics structure of *Ceriops tagal* (Rhizophraceae) in Thailand and China. *Wetland Ecology and Management*, 2001, (9): 203~209.

[24] Li H S, Chen G Z. Genetic diversity of *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae) in China detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis. *Guihaia*, **24**(1): 17~22.

[25] Hamrick J L, Loveless M D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: Bock J H, Linhart Y B, eds. *The Evolutionary Ecology of Plants*. Boulder: Westview Press, 1989. 129~146.

[26] Abeysinghe P D, Triest L, Greef B D, *et al*. Genetic and geographic variation of the mangrove tree *Bruguiera gymnorhiza* in Sri Lanka. *Aquatic Botany*, 2000, **67**: 131~144.

[27] Wang X Q, Zou Y P, Zhang D M, *et al*. Genetic diversity of *Cathaya argyrophylla* based on random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Science in China (Series C)*, 1996, **26**(5): 436~441.

[28] Chen X Y, Song Y C. Clonal diversity in *Cyclobalanopsis glauca* populations and its relationship with environmental factors. *Acta Phytocologica Sinica*, 1997, **21**(4): 342~348.

[29] Li D, Peng S L. Genetic diversity in three *Pinus massoniana* populations in different elevations and its relationship with ecological factors. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, **21**(3): 415~421.

[30] Xu Li, Wang Y L, Wang X M, *et al*. Genetic structure of *Reaumuria soongorica* population in Fukang desert, Xinjiang and its relationship with ecological factors. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(7): 787~794.

[31] Wright S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 1951, **15**: 323~354.

[32] Muller J. New observation on pollen morphology and fossil distribution of the genus *Sonneratia*. *Rev. Palaeobotan Palynol.*, 1978, (26): 83~92.

[33] Zheng Z, Zhou K S. Discovery of *Sonneratia* pollen in the late pleistocene sediments along Guangdong coasts. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1995, **34**(4): 88~92.

参考文献:

[2] 张凤仙,刘梅芳. 海桑属植物果胶的研究. 中国科学院华南植物所集刊,1994,**9**:116~119.

[3] 陈泽濂. 国产海桑属(*Sonneratia* Linn. f.)植物的形态解剖. 热带亚热带植物学报,1996,**4**(2):18~24.

[4] 邓传远,林清贤,林鹏,等. 海桑属(*Sonneratia*)6种红树植物的木材解剖特性及其应用. 福建林业科技,2000,**27**(3):1~5.

[5] 黄桂玲,黄庆昌. 中国红树植物的营养器官结构与生态适应. 生态科学,1989(1):100~105.

[6] 黄庆昌,黄桂玲,杨曼玲. 红树植物地上根端的发育、结构与生态适应. 植物学报,1994,**36**(8):592~596.

[8] 廖宝文,郑德璋,郑松发,等. 海桑育苗技术及其幼苗生长规律的研究. 林业科学研究,1997,**10**(3):296~302.

[14] 祁建民,周东新,吴为人,等. 用 ISSR 标记检测黄麻野生种与栽培种遗传多样性. 应用生态学报,2003,**14**(9):1473~1477.

[15] 葛永奇,邱英雄,丁炳扬,等. 子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析. 生物多样性,2003,**11**(4):276~287.

[24] 李海生,陈桂珠. 中国卵叶海桑遗传多样性的 ISSR 研究. 广西植物,2004,**24**(1):17~22.

[27] 汪小全,邹喻苹,张大明,等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析. 中国科学(C 辑),1996,**26**(5):436~441.

[28] 陈小勇,宋永昌. 青冈种群克隆多样性及其与环境因子的关系. 植物生态学报,1997,**21**(4):342~348.

[29] 李丹,彭少麟. 三个不同海拔梯度马尾松种群的遗传多样性及其与生态因子的相关性. 生态学报,2001, **21**(3):415~421.

[33] 郑卓,周昆叔. 海桑属花粉在广东沿岸晚更新世地层的发现. 中山大学学报(自然科学版),1995,**34**(5):88~92.