

华木莲居群遗传结构与保护单元

熊 敏^{1,2} 田 双¹ 张志荣³ 范邓妹¹ 张志勇^{1,4*}

1 (江西农业大学亚热带生物多样性实验室, 南昌 330045)

2 (南昌师范学院理学院, 南昌 330000)

3 (中国科学院昆明植物研究所, 中国西南野生生物种质资源库, 昆明 650201)

4 (中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093)

摘要: 华木莲(*Sinomanglietia glauca*)仅分布于江西宜春和湖南永顺, 是我国一级重点保护植物。前人采用RAPD、ISSR以及叶绿体SSCP(single-stranded conformation polymorphism)标记对华木莲进行了居群遗传学研究, 但未包括后发现的湖南居群或未检出居群内遗传变异。为了全面检测华木莲遗传多样性及其空间分布格局, 并据此确定保护单元, 本研究采用细胞核微卫星标记对华木莲所有4个居群共77个个体进行了居群遗传学分析。结果表明, 华木莲具有较低的遗传多样性(平均等位基因数 $A = 2.604$, 平均期望杂合度 $H_E = 0.423$)和较高的遗传分化($F_{ST} = 0.425$)。STRUCTURE和主成分分析(Principal Coordinated Analysis, PCA)将4个居群首先分为江西、湖南两组, 江西的2个居群实际上是同一个自然繁育居群, 而湖南的2个居群则为2个分化明显的自然繁育居群。研究还发现湖南居群存在明显的杂合子过剩现象, 可能是小居群内随机因素造成的。研究结果表明华木莲可能在近期历史上遭受过强烈的瓶颈效应, 导致种群缩小、遗传多样性丧失和居群分化加剧, 需要加强对其进化潜力的保护。在制定保护措施时, 需要考虑其较高的遗传分化水平, 根据遗传结构可以将其划分为3个保护单元, 即湖南居群和江西居群分别为2个进化显著单元, 湖南居群进一步划分为2个管理单元(分别为朗溪乡云盘村和小溪乡鲁家村居群)。

关键词: *Sinomanglietia glauca*, 微卫星, 遗传多样性, 遗传结构, 保护单元

Population genetic structure and conservation units of *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae)

Min Xiong^{1,2}, Shuang Tian¹, Zhirong Zhang³, Dengmei Fan¹, Zhiyong Zhang^{1,4*}

1 Laboratory of Subtropical Biodiversity, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045

2 College of Sciences, Nanchang Normal University, Nanchang 330000

3 China Germplasm Bank of Wild Species / Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201

4 State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093

Abstract: *Sinomanglietia glauca*, a species endemic to Yichun in Jiangxi Province and Yongshun of Hunan Province in Central China, was listed as Category I of the National Key Protected Wild Plants in 1999 (as a synonym of *Manglietia decidua*). Several studies on the population genetics of this endangered species have been reported. However, these studies either excluded Hunan populations or failed to detect any variation within populations. In this study, all four known populations of *S. glauca* found were used to investigate genetic diversity and genetic structure using nuclear microsatellite markers. Our results showed that *S. glauca* had relatively low genetic diversity ($A = 2.604$, $H_E = 0.423$) and significant population differentiation ($F_{ST} = 0.425$). Assignments analysis by STRUCTURE and Principal Coordinated Analysis indicated that Jiangxi and Hunan populations formed two independent groups. Only one natural breeding population was identified in Jiangxi whereas two were revealed in Hunan. We found a striking heterozygosity excess in the Hunan popu-

收稿日期: 2014-01-21; 接受日期: 2014-05-20

基金项目: 江西省自然科学基金(2009GZN0016)、中科院植物所系统与进化植物学国家重点实验室开放课题、江西省教育厅落地计划项目(KJLD12062)、国家科技支撑计划(2012BAC11B02)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: pinus-rubus@163.com

lations, a phenomenon that might be caused by allelic frequencies differing between male and female parents by chance alone within small population. The results of this study suggest that *S. glauca* could have experienced recent historic bottleneck(s) which resulted in reduction of population size, loss of genetic diversity and strong population differentiation. The distribution pattern of genetic diversity clearly indicates that *S. glauca* should be treated as three conservation units, i.e., two evolutionarily units (Jiangxi unit and Hunan unit), and Hunan ESU subdivided into two management units (YPC and LJC).

Key words: *Sinomanglietia glauca*, microsatellite, genetic diversity, genetic structure, conservation unit

一个物种只有具备足够多的遗传变异,才可能适应剧烈变化的环境(Frankel & Soule, 1981),因此,在全球气候变化的背景下,如何有效保护物种的进化潜力成为人类共同关心的问题(Frankham, 1995, 2002; Stockwell *et al.*, 2003)。基于中性分子标记手段,保护生物学家们提出了诸多物种遗传多样性保护措施,最著名的是设立进化显著单元(evolutionarily significant units, ESUs)和管理单元(management units, MUs)(Ryder, 1986; Moritz, 1994)。Moritz (1994)对进化显著单元和管理单元分别给出了比较明确的定义。ESUs指的是在动物线粒体DNA(植物常采用叶绿体DNA,如Cavers *et al.*, 2003)水平上互为单系群(monophyletic group),并且在核基因水平上存在显著的基因频率差异的居群;MUs指的是在核基因位点上基因频率差异显著的居群。虽然ESUs和MUs(统称为保护单元conservation units, CUs)在概念和应用上受到一些学者的质疑(如Crandall *et al.*, 2000),但是它们依然是保护遗传学中应用最为广泛的概念之一。

华木莲(*Sinomanglietia glauca*)最初于1994年发表为木兰科单种植物(俞志雄, 1994),1995年被郑庆衍先生处理为落叶木莲(*Manglietia decidua*),此后,Kumar(2006)将该种归入木兰属(*Magnolia*)。鉴于目前木兰科分类处于不稳定的阶段,大属与小属的概念争论不休(孙卫邦和周俊, 2004; Xia *et al.*, 2008),在尘埃落定前,本文参照优先律原则采用最早的名称即华木莲(*Sinomanglietia glauca*)。华木莲的花部特征与木莲属相似,但落叶的特性却与木兰属部分种类相同,而奇特的果实开裂方式则表明它是一个非常特殊的类群,这些特点决定了该种在系统学研究上具有重要的理论意义。吴征镒等(2003)在《中国被子植物科属综论》中专门提及该植物在木兰科系统演化中的重要地位。华木莲在发表之初仅在江西宜春明月山发现,种群数量非常有限,

1999年被列为我国一级保护植物(国家重点保护野生植物名录·第一批)(<http://www.forestry.gov.cn/portal/main/s/3094/minglu1.htm>)。另外,华木莲的社会影响也非常大,江西省宜春市将它评为市花,它对于唤醒民众的自然保护意识,促进江西自然保护事业和发展生态友好型社会具有特殊意义。

华木莲发表以后,有关学者对其进行了长期深入的研究,研究内容涉及细胞学、解剖学、生态学、居群遗传学、胚胎学、系统学等内容(肖德兴等, 1998; 俞志雄等, 1999; 郭起荣等, 2003; 林新春等, 2003; 廖文芳等, 2004; 裘利洪等, 2004; 肖德兴和俞志雄, 2004; Nie *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009)。在这些研究中,林新春等(2003)和廖文芳等(2004)分别采用RAPD和ISSR两种分子标记对宜春明月山居群进行了遗传学研究。但是2003年,我国林业工作者在湖南永顺县武陵山调查时发现了2个华木莲居群(侯伯鑫等, 2006),分别位于永顺县东南小溪国家级自然保护区鲁家村和邻近的朗溪乡云盘村。由于湖南居群发现较晚,上述两文均未包括新发现的湖南居群。为了探讨江西居群与湖南居群的遗传差异,Zhang等(2009)采用叶绿体单链构象多态(single-stranded conformation polymorphism, SSCP)标记对所有华木莲居群进行了研究,发现江西居群和湖南居群属于不同的遗传类型,可以划定为2个进化显著单元。但是,由于前人研究所选择的分子标记都存在一些问题,如RAPD和ISSR为显性标记且重复性不高,而叶绿体PCR-SSCP进化速率较低,不能揭示居群内的遗传变异。为了进一步揭示华木莲居群内的遗传变异水平、居群遗传结构和可能存在的遗传学风险等,需要采用变异更丰富的共显性分子标记(如微卫星标记, simple sequence repeats, SSR)。基于以上认识,本研究采用核基因组微卫星分子标记对华木莲4个居群进行遗传结构研究,以期回答以下3个问题:(1)核基因组标记是否能检测到与叶

绿体SSCP标记一致的居群遗传结构? (2)核基因组在两个地区内的遗传变异有多大? (3)每个地区内是否存在不同的保护单元?

1 材料和方法

1.1 样品采集和总DNA提取

本研究采集了湖南永顺、江西宜春两个地区的4个华木莲野生居群, 每个居群视采样难易程度、居群大小等情况各取14–23个个体的顶端健康叶片, 共77个样品。应用全球定位系统记录采样居群的经度、纬度及海拔(表1)。总DNA提取方法见Zhang等(2009)。

1.2 微卫星引物及PCR扩增和分型

本研究共采用13个微卫星位点进行居群遗传

分析, 其中7个位点(SSR1, SSR65, SSR74, SSR215, L76, L78, L82)是前期研究中开发出来的(熊敏等, 2011), 6个位点是从日本厚朴(*Magnolia obovata*, Isagi *et al.*, 1999)和星花木兰(*Magnolia steliata*, Setsuko *et al.*, 2005)的微卫星引物中筛选出的(表2)。PCR反应体系为20 μ L, 包括10 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix(Tiagen; 成分: 0.1 U/ μ L Taq聚合酶, 0.5 mM dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH = 8.3), 100 mM[^] KCl以及3 mM MgCl₂), 0.5 μ M 引物, 20–50 ng总DNA, 加水至20 μ L。PCR扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min; 94 $^{\circ}$ C变性45 s, 50–66.5 $^{\circ}$ C退火45 s(见表2和熊敏等, 2011), 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 33个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 4 $^{\circ}$ C保存。PCR扩增反应产物采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测并拍照, 并采用QIAxcel毛细管电泳系统

表1 华木莲4个野生居群的地理分布和取样数量
Table 1 Geographic locations and sample sizes of four wild populations of *Sinomanglietia glauca*

居群 Population	采集地点 Location	样品数 Sample size	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Alt. (m)
云盘村 YPC	湖南省永顺县朗溪乡云盘村 Yunpan Village, Langxi Town, Yongshun County, Hunan Province	21	28°57.121' N	110°17.398' E	674
鲁家村 LJC	湖南省永顺县小溪乡鲁家村 Lujia Village, Xiaoxi Town, Yongshun County, Hunan Province	19	28°52.051' N	110°15.473' E	660
洪江村 HJC	江西省宜春市洪江乡洪江村 Hongjiang Village, Hongjiang Town, Yichun, Jiangxi Province	23	27°35.654' N	114°21.059' E	718
玉金山 YJS	江西省宜春市洪江乡玉金山 Mt.Yujin, Hongjiang Town, Yichun, Jiangxi Province	14	27°34.367' N	114°19.276' E	720

表2 从星花木兰和日本厚朴微卫星引物中筛选出来的6个位点
Table 2 The six microsatellite loci screened out from *Magnolia steliata* and *Magnolia obovata*

位点 Locus	重复单元 Repeat motif	引物 Primer Sequence (5'–3')	退火温度 Ta ($^{\circ}$ C)	片段长度 Size range (bp)
STM0222*	(GA) ₂₆	F: ATGGATGGACAGCGTAAA R: GGCCCATCTTGTTGTATGTA	60.0	170
STM0246*	(GA) ₃₃	F: AAGCAAAGCCTCCTAGGTC R: TCTACGCCTAACAGGTCTGTC	58.0	186
M6D3**	(CT) ₂₂	F: ACATGGATAGTCGTTGGATA R: ACCCCACTGAAGACAAACAT	50.0	131
M6D10**	(GA) ₁₄	F: AAATTGTCGTCCAACCAAGTT R: AAAGCAGCAAACAGGAAGAG	51.8	161
M10D8**	(GAA) ₆ (GA) ₂₆	F: AGCCCTCTATACACGCACACAT R: CGGAGCTACAAGGAGCAGAATA	52.6	297
M15D5**	(GA) ₁₆	F: GATCGTTGCTGGCTCGC R: GCCGCCTGGATTATGAA	52.7	100

*引物来自星花木兰(*Magnolia steliata*, Setsuko *et al.*, 2005); **引物来自日本厚朴(*Magnolia obovata*, Isagi *et al.*, 1999)。
* Primers screened out from *Magnolia steliata* (Setsuko *et al.*, 2005), ** Primers screened out *Magnolia obovata* (Isagi *et al.*, 1999)。

(Qiagen, Irvine, USA)对部分PCR产物进行验证。

1.3 数据分析

微卫星为共显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性, 视每条多态性条带为一个等位基因。根据聚丙烯酰胺凝胶电泳图并参考毛细管电泳结果按条带大小从小到大进行编号。利用GENEPOP V.3.4软件(Raymond & Rousset, 1995)来计算每个位点对是否连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD), 并对所有值进行多重比较(sequential bonferroni correction)来分析其调整后的显著性水平(Rice, 1989)。利用GenALEx V.6.3软件(Peakall & Smouse, 2006)计算平均等位基因数(A)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon多样性指数(I)和多态位点百分数(PPB)。利用FSTAT软件(Goudet, 1995)计算每个居群的近交系数(F_{IS})及显著度。采用GenALEx V.6.3软件(Peakall & Smouse, 2006)对居群进行主成分分析(principal coordinated analysis, PCA)。采用ARLEQUIN V. 3.1软件(Excoffier *et al.*, 2005)对每个位点的遗传分化系数(F_{ST})及其显著度进行计算。采用STRUCTURE V.2.2软件(Pritchard *et al.*, 2000)对77个个体进行居群分组聚类分析(assignment analysis), 使用完整的Bayesian聚类方法来检验预先划分的居群与按照遗传背景进行的分组相一致的程度。因为此软件的运算前提是要符合Hardy-Weinberg平衡和连锁平衡, 而在自然居群中, 多为同域分布、自然杂交频繁的物种, 基本不符合Hardy-Weinberg平衡和连锁平衡, 因此运算直接用实际居群(K)值。采用相关等位基因频率而不含任何居群来源信息的混合祖先模型(“admixture” model)来对华木莲居群的遗传结构进行分析。STRUCTURE程序运行中

的参数“Length of burn-in-period”为10,000, “Number of MCMC Reps after Burnin”为10,000, K 值定义为1–4, 每个 K 值运行10次, 通过计算连续 K 值之间 $L(K)$ 变化率的大小(ΔK)来作折线图选择最佳 K 值, 即得到最佳居群分组数。采用BOTTLENECK V.1.1.02 软件(Cornuet & Luikart, 1996)来检测基于IAM、SMM 和TPM 3种模型下华木莲野生居群近期是否经历了遗传瓶颈现象。

2 结果

2.1 遗传多样性

本文采用13对微卫星引物对华木莲4个野生居群的77个样品进行扩增, 共检测到53个等位基因, 每个位点的等位基因数为2–7个, 平均每个位点4.1个。在整体水平上, 每个微卫星位点的连锁不平衡(LD)检测结果表明, 78个位点对呈现出显著连锁不平衡($P < 0.05$)。但是经过Bonferroni校正后, 0.05的显著度被校正到0.00064, 78个位点对中49个表现为连锁不平衡。

各居群的平均等位基因数(A)从1.385(居群YPC)至3.308(居群HJC), 平均值为2.604(表3)。期望杂合度(H_e)从0.182(居群YPC)至0.522(居群HJC), 平均值为0.423。居群YPC的多态位点百分数最低($PPB = 38.46\%$), 该居群在除STM0222位点外的其余12个位点上都为单态, 其次是居群LJC($PPB = 69.23\%$), 该居群在除SSR215、L78、M6D3、M10D8、M15D5位点外其余7个位点上均为单态。居群HJC和居群YJS的多态位点百分数都为100%, 平均多态性位点百分数 $PPB = 76.92\%$ 。每个居群的近交系数(F_{IS})差异较大, 从–0.889(居群YPC)至0.136(居群YJS), 平均值为–0.292(表3)。从表3中可以看出, 来

表3 华木莲在野生居群水平的遗传参数统计表
Table 3 Summary of genetic statistics for *Sinomanglietia glauca* in wild populations

居群 Population	N	A	N_e	H_o	H_e	F_{IS}	I	PPB (%)
云盘村 YPC	21	1.385	1.351	0.344	0.182	–0.889**	0.255	38.46
鲁家村 LJC	19	1.769	1.684	0.495	0.344	–0.476**	0.487	69.23
洪江乡 HJC	23	3.308	2.319	0.501	0.522	0.062	0.910	100.00
玉金山 YJS	14	2.923	2.246	0.462	0.511	0.136*	0.850	100.00
平均 Mean	19.3	2.604	1.991	0.451	0.423	–0.292	0.696	76.92

A : 平均等位基因数; N_e : 有效等位基因数; H_o : 观测杂合度; H_e : 期望杂合度; F_{IS} : 居群内的近交系数; I : Shannon多样性指数; PPB : 多态位点百分数。* $0.05 > P > 0.01$, ** $0.01 > P > 0.001$ 。居群代号同表1。
 A , Number of alleles; N_e , Number of effective alleles; H_o , Observed heterozygosity; H_e , Expected heterozygosity; F_{IS} , Inbreeding coefficient; I , Shannon’s information indexes; PPB , Percentage of polymorphic loci. * $0.05 > P > 0.01$, ** $0.01 > P > 0.001$. Population codes see Table 1.

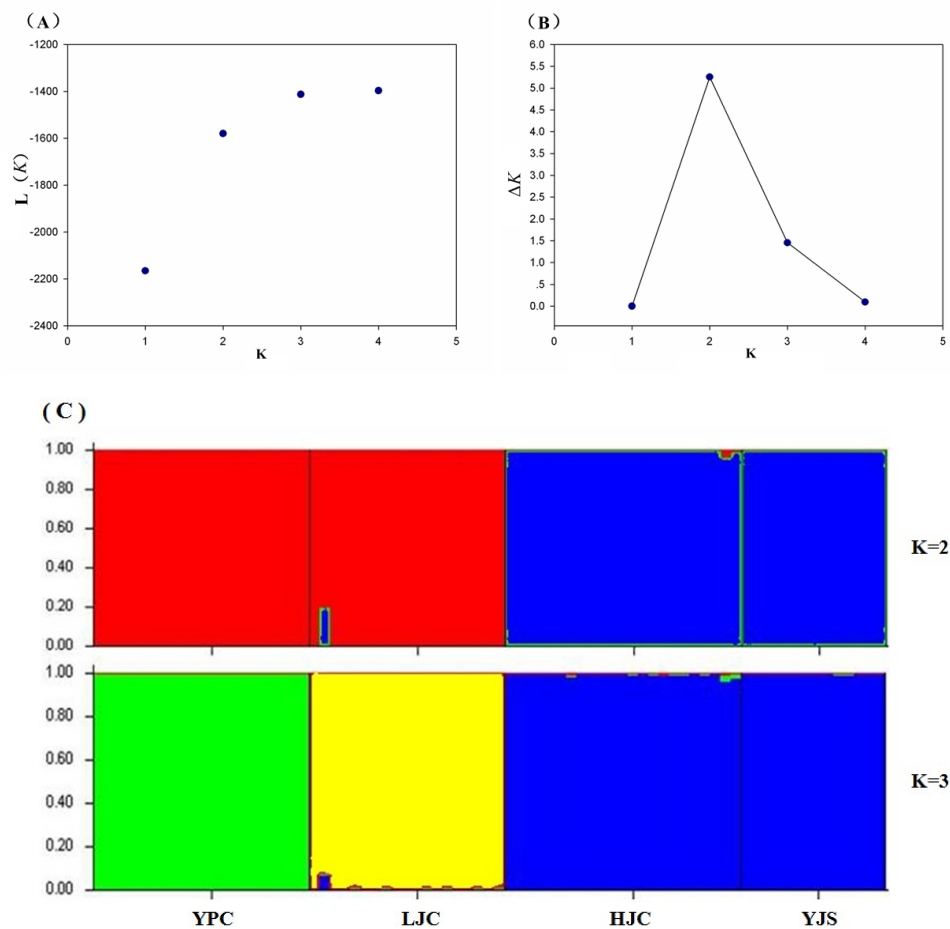


图1 基于13个SSR标记的华木莲居群STRUCTURE分析。(A)、(B)分别表示基于10次重复的特定 K 值对应的概率对数值 $L(K)$ 和统计量 ΔK ; (C) $K = 2, 3$ 时各采样居群所有个体分配情况。
Fig. 1 Results of STRUCTURE analysis based on all the individuals in four populations of *Sinomanglietia glauca* using 13 polymorphic microsatellite loci. (A) and (B) mean likelihood $L(K)$ and ΔK value per K value with ten replications, respectively; (C) assignments proportion of each individuals from four sampled populations when $K = 2$ and 3.

自湖南永顺县朗溪乡云盘村居群(YPC)的遗传多样性最低, 而来自江西宜春洪江乡居群(HJC)的遗传多样性最高。

2.2 遗传结构和瓶颈效应检测

成对居群间的遗传分化系数(F_{ST})值的显著度都为显著。遗传分化系数(F_{ST})在不同的位点有较大的差异, 变化范围从0.098–0.637, 平均为0.425(数据未列出), 说明华木莲居群间的基因流相对有限。来自湖南的居群YPC和来自江西的居群YJS的遗传距离最大(0.5857), 来自江西的2个居群遗传距离最小(0.0692)(结果未列出)。采用STRUCTURE V.2.2软件对华木莲77个个体进行分组聚类分析(assignment analysis), 结果显示, 当 $K = 2$ 的时候, ΔK 值

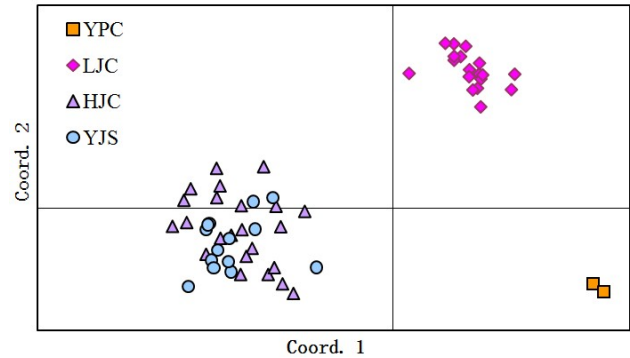


图2 基于SSR数据的华木莲4个野生居群的主成分分析(PCA)
Fig. 2 Principal coordinated analysis of four wild populations of *Sinomanglietia glauca* based on SSR data

为最大值(图1B)。组I包括居群YPC和LJC, 全部来自湖南; 组II包括居群HJC和YJS, 全部来自江西。当 $K = 3$ 时, $L(K)$ 值达到平台值(图1A), 来自湖南的2个居群分成了2个明显的亚组, 而来自江西的2个居群仍然在一个组(图1C)。这一分组情况与利用 GenALEx V.6.3 软件对华木莲野生居群进行的主成分分析(PCA)结果一致。从PCA结果能看出, 所有华木莲个体在坐标1上分为两组(即江西和湖南), 但在坐标2上湖南居群进一步分为2个亚组(LJC和YPC)(图2)。

对华木莲野生居群的遗传瓶颈检测结果表明, 在IAM模型和TPM模型下华木莲4个居群都出现种群统计上的遗传瓶颈(Wilcoxon统计分析 $P < 0.05$); 基于SMM模型, 除了居群YJS外其他3个居群也显著存在近期的瓶颈效应(表4)。

表4 基于3种模型(IAM、SMM 和 TPM)下华木莲4个居群的瓶颈效应检验

Table 4 Probabilities from tests for population bottlenecks in four population of *Sinomanglietia glauca* under the three models (IAM, SMM and TPM)

居群 Pop.	突变-漂变平衡检测模型 Mutation-drift test model		
	无限等位基因模型 IAM	逐步突变模型 SMM	两相模型 TPM
YPC	0.03125*	0.03125*	0.03125*
LJC	0.00195**	0.00195**	0.00195**
HJC	0.00012***	0.04785*	0.00024**
YJS	0.00305**	0.12720	0.02148*

* $0.05 > P > 0.01$, ** $0.01 > P > 0.001$, *** $P < 0.001$. 居群代号同表1. Population codes see Table 1.

3 讨论

3.1 华木莲的遗传多样性

华木莲是我国一级重点保护植物, 其遗传多样性水平受到关注。林新春等(2003)和廖文芳等(2004)分别采用RAPD和ISSR分子标记对宜春居群进行了调查, 发现其遗传多样性水平低于观光木(*Tsoogiodendron odorum*)、鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)、乐昌含笑(*Michelia chapens*)等木兰科植物, 但是这些研究未包括湖南居群。在另一个包括湖南居群的研究中, Zhang等(2009)发现地区内缺乏叶绿体基因组遗传变异。本研究基于核基因组微卫星标记对所有华木莲居群的检测结果表明, 4个居群平均每个位点等位基因数和期望杂合度分别为

2.604和0.423, 低于采用相同标记的观光木($A = 3.8$, $H_E = 0.522$, 王霞等, 2012)和天女木兰(*Magnoliz sieboldii*) ($A = 3.74$, $H_E = 0.427$, Kikuchi & Isagi, 2002)等木兰科濒危植物; 两个地区的上述指数相比, 湖南居群又远远低于江西居群(表3)。以上研究所采用的分子标记各不相同、采样策略也有所差异, 但研究结果却非常一致, 即华木莲是一个遗传多样性较为贫乏的物种。这一结果与华木莲的濒危状况是一致的。我们通过瓶颈效应检测发现, 4个华木莲居群均检测到显著的近期居群衰退, 说明华木莲可能遭受较强的自然或人为破坏, 导致居群急剧缩小和遗传多样性丧失。

3.2 华木莲湖南居群的杂合子过剩

在隔离的小居群中, 交配往往被迫发生在有亲缘关系的个体间, 从而导致近交系数偏高, 甚至出现近交衰退(Frankham *et al.*, 2002)。华木莲分布在4个孤立的居群中, 我们预测这些居群可能出现明显的杂合子缺失(即近交系数 F_{IS} 为正值), 江西玉金山居群的 F_{IS} 为显著的正值, 与我们的预测较为一致, 说明江西玉金山居群存在不同程度的近交。但是, 湖南的2个居群都为显著的负值, 说明这2个居群存在明显的杂合子过剩现象, 与我们的预测完全相反。通常情况下, 造成居群内杂合子过剩的原因有繁殖居群过小、杂种优势、无性繁殖以及采样策略等(Keller & Waller, 2002; Stoeckel *et al.*, 2006; Rasmussen & Kollmann, 2008; 王霞等, 2012)。由于缺乏进一步的实验数据, 我们尚不能排除杂种优势这一可能性, 但杂种优势往往造成幼年个体的杂合度高于成年个体, 然而, 我们检测了一个人工繁育苗圃中华木莲幼树的杂合度(来自朗溪乡云盘村居群), 其杂合度却低于野生居群(另文发表), 说明杂种优势可能不成立。无性繁殖也是杂合子过剩的主要原因之一(Stoeckel *et al.*, 2006), 然而多年的野外考察中并没有发现华木莲具备萌蘖等无性繁殖习性, 扦插实验也屡屡失败(俞志雄, 个人观察资料), 说明无性繁殖并不能解释湖南居群杂合子过剩现象。但是, 目前尚不能排除华木莲无融合生殖的可能性。

杂合子过剩的另一种可能原因是有效居群小。在小居群中, 父本与母本的等位基因频率因为偶然因素差异明显, 从而导致后代个体出现杂合现象(Pudovkin *et al.*, 1996)。侯伯鑫等(2006)曾对华木莲湖南居群进行过统计, 该报道称朗溪乡云盘村有

4,000株成年个体,而小溪乡鲁家村有1,000余株成年个体。但是,本课题组3次(分别为2006年9月、2007年5月、2013年10月)前往湖南永顺,均未发现有如此多的个体。在小溪居群,我们甚至很难找到20个个体。因此,华木莲的2个湖南居群大小可能远远低于侯伯鑫等(2006)报道的数字。另外,不同位点的连锁不平衡检验表明,78个位点对全部为显著不平衡($P < 0.05$),即使经过Bonferroni校正后,78个位点对中仍有49个表现为连锁不平衡。高度的连锁不平衡往往是经历近期瓶颈效应后小居群的特征(Hayes *et al.*, 2003),因此,华木莲的2个湖南居群可能均为遭受瓶颈后的小居群,由于随机事件导致2个居群出现杂合子过剩。

另外,采样策略也有可能造成杂合子过剩(Keller & Waller, 2002)。由于华木莲分布范围非常狭窄,而且种子传播距离较近,有明显的集群现象(个人观察),为了得到符合居群遗传学要求的样品,采集到同一亲本来源植株的可能性大大增加。这一点以云盘村最为明显,该居群植株较为密集且年龄相仿(从树的胸径来判断),推测可能来源于某一个结实大年的少数几棵母树,从而造成该居群强烈的杂合子过剩。

3.3 华木莲遗传结构与保护单元

Zhang等(2009)采用叶绿体标记发现华木莲江西居群与湖南居群分化强烈,是两个完全不同的遗传单元(genetic units)。本研究的结果也清晰地表明,江西居群与湖南居群在STRUCTURE和PCA分析中首先分为2组(图1和图2),应该视为2个不同的进化显著单元(ESUs)。本研究结果还显示江西的两个居群没有遗传分化,构成一个自然繁育居群,应该视为一个管理单元。而湖南的2个居群则出现明显的遗传分化,构成2个自然繁育居群,说明应该视为单独的管理单元加以保护。

华木莲的遗传结构可能是历史和生态因素综合影响的结果。近年来植物谱系学研究表明,第四纪气候变化过程中,中国亚热带植物经历了复杂的分布区变迁,但总体呈现多个冰期避难所和有限的冰后期(或间冰期)扩张格局(Qiu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013)。因此,华木莲江西-湖南间断分布格局有可能是第四纪冰期避难的结果。相反,湖南2个居群的遗传分化则有可能是山体隔离造成的。永顺地处武陵山区,山势

陡峭,2个华木莲湖南居群的遗传分化可能是生态隔离产生的。另外,人为破坏也可能对遗传分化造成影响。野外调查中发现2个湖南居群附近森林砍伐都非常严重,处于小溪国家级自然保护区外的朗溪乡居群至今还受到人为破坏的影响。江西的2个居群在STRUCTURE和PCA分析中聚在一起,其原因是2个居群生长在同一个山体上,两者之间存在频繁的基因流,两个居群的界定是人为的。

3.4 华木莲的保护措施

从本文和前人的研究结果可以看出,华木莲遗传多样性较低且遗传分化较大,与银杉(*Cathaya argyrophylla*)等植物一样(Ge *et al.*, 1998),具有典型的孑遗类群遗传特征,因此,在制定保护措施时首先要考虑的是扩大有效居群大小(N_e),保存其现有的遗传多样性(金燕和卢宝荣, 2003)。由于华木莲种子萌发率较高(俞志雄, 个人观察资料),收集野生华木莲种子进行人工繁殖和回归,可有效提高其居群大小。但是,在进行人工增强回归工作时,应尽量避免湖南与江西居群的混杂,因为它们属于不同的显著进化单元。另外,本研究也检测到强烈的近期瓶颈效应,说明人类活动对华木莲及其生境的破坏比较严重。目前,江西居群和湖南云盘村居群没有纳入自然保护区范围内,采种、砍伐、森林抚育等人为干扰非常严重,建议相关部门尽快制定措施,设立自然保护区或保护小区,使华木莲及其生境得到有效保护。

致谢: 本研究野外调查得到江西省宜春市森工局张津平、湖南省小溪国家级自然保护区田永祥和鲁成贵等同志的协助。

参考文献

- Cavers S, Navarro C, Lowe AJ (2003) A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics*, **4**, 571–580.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001–2014.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 290–295.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version

- 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47.
- Frankel OH, Soulé ME (1981) *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R (1995) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, **29**, 305–327.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ge S, Hong DY, Wang HQ, Liu ZY, Zhang CM (1998) Population genetic structure and conservation of an endangered conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **159**, 351–357.
- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Guo QR (郭起荣), Yu ZX (俞志雄), Shi JM (施建敏) (2003) A physio-ecological study on photosynthesis of *Sinomanglietia glauca* and two species in *Manglietia* Bl. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **25**, 645–651. (in Chinese with English abstract)
- Hayes BJ, Visscher PM, McPartlan HC, Goddard ME (2003) Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Research*, **13**, 635–643.
- Hou BX (侯伯鑫), Yi H (易宏), Lin F (林峰), Tian XZ (田学洲), Yu GF (余格非), Chen JF (陈家法) (2006) Investigation on resource of *Manglietia decidua* of Yongshun County in Hunan. *Hunan Forestry Science and Technology* (湖南林业科技), **33**, 11–14. (in Chinese with English abstract)
- Isagi Y, Kanazashi T, Suzuki W, Tanaka H, Abe T (1999) Polymorphic microsatellite DNA markers for *Magnolia obovata* Thunb. and their utility in related species. *Molecular Ecology*, **8**, 698–700.
- Jin Y (金燕), Lu BR (卢宝荣) (2003) Sampling strategy for genetic diversity. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11**, 155–161. (in Chinese with English abstract)
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 230–241.
- Kikuchi S, Isagi Y (2002) Microsatellite genetic variation in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* spp. *japonica*. *Heredity*, **88**, 313–321.
- Kumar VS (2006) New combinations and new names in Asian Magnoliaceae. *Kew Bulletin*, **61**, 183–186.
- Lei M, Wang Q, Wu ZJ, López-Pujol J, Li DZ, Zhang ZY (2012) Molecular phylogeography of *Fagus engleriana* (Fagaceae) in subtropical China: limited admixture among multiple refugia. *Tree Genetics and Genomes*, **8**, 1203–1212.
- Liao WF (廖文芳), Xia NH (夏念和), Deng YF (邓云飞), Zheng QY (郑庆衍) (2004) Study on genetic diversity of *Manglietia decidua* (Magnoliaceae). *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **26**, 58–64. (in Chinese with English abstract)
- Lin XC (林新春), Yu ZX (俞志雄), Qiu LH (裘利洪), Xiao GM (肖国民), Liu L (刘力) (2003) Studies on genetic diversity of endangered *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae). *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **25**, 805–810. (in Chinese with English abstract)
- Liu JQ, Sun YS, Ge XJ, Gao LM, Qiu YX (2012) Phylogeographic studies of plants in China: advances in the past and directions in the future. *Journal of Systematics and Evolution*, **50**, 267–275.
- Moritz C (1994) Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373–375.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238–254.
- Nie ZL, Wen J, Azuma H, Qiu YL, Sun H, Meng Y, Sun WB, Zimmer EA (2008) Phylogenetic and biogeographic complexity of Magnoliaceae in the northern hemisphere inferred from three nuclear data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**, 1027–1040.
- Peakall ROD, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288–295.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Pudovkin AI, Zaykin DV, Hedgecock D (1996) On the potential for estimating the effective number of breeder from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*, **144**, 383–387.
- Qiu LH (裘利洪), Yu ZX (俞志雄), Shi JM (施建敏), Zhang JP (张津平), Xie DM (谢冬明), Xiao GM (肖国民), Liao J (廖军) (2004) Studies on interspecific association of communities with *Sinomanglietia glauca*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **26**, 25–30. (in Chinese with English abstract)
- Qiu YX, Fu CX, Comes HP (2011) Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environment change in the world’s most diverse temperate flora. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **59**, 225–244.
- Rasmussen KK, Kollmann J (2008) Low genetic diversity in small peripheral populations of a rare European tree (*Sorbus torminalis*) dominated by clonal reproduction. *Conservation Genetics*, **9**, 1533–1539.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, **1**, 9–10.
- Setsuko S, Ueno S, Tsumura Y (2005) Development of microsatellite markers in *Magnolia stellata* (Magnoliaceae), a threatened Japanese tree. *Conservation Genetics*, **6**, 317–320.

- Stockwell CA, Hendry AP, Kinnison MT (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 94–101.
- Stoeckel S, Grange J, Fernández-Manjarres JF, Isabelle B, Frascaria-Lacoste N, Mariette S (2006) Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species—*Prunus avium* L. *Molecular Ecology*, **15**, 2109–2118.
- Sun WB (孙卫邦), Zhou J (周俊) (2004) A new proposal on genetic division of the Chinese Magnoliaceae. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **26**, 139–147. (in Chinese with English abstract)
- Wang X (王霞), Wang J (王静), Jiang JH (蒋敬虎), Kang M (康明) (2012) Genetic diversity and the mating system in a fragmented population of *Tsoongiodendron odorum*. *Biodiversity Science* (生物多样性), **20**, 676–684. (in Chinese with English abstract)
- Wu ZY (吴征镒), Lu AM (路安民), Tang YC (汤彦承), Chen ZD (陈之端), Li DZ (李德铎) (2004) *The Families and Genera of Angiosperms in China* (中国被子植物科属综论). Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Xia NH, Liu YH, Nooteboom HP (2008) Magnoliaceae. In: *Flora of China* (eds Wu ZY, Raven PH, Hong DY), vol. 7. pp. 48–91. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Xiao DX (肖德兴), Yu ZX (俞志雄), Lin XC (林新春), Zhang JP (张津平) (1998) Karyotype analysis of *Sinomanglietia glauca* Z.X.Yu et Q.Y. Zheng. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **20**, 56–59. (in Chinese with English abstract)
- Xiao DX (肖德兴), Yu ZX (俞志雄) (2004) Anther development in *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae). *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), **12**, 309–312. (in Chinese with English abstract)
- Xiong M (熊敏), Wang J (王静), Zhang ZR (张志荣), Zhang ZY (张志勇) (2011) The development of nuclear microsatellite markers for an endangered plant, *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae). *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **33**, 535–539. (in Chinese with English abstract)
- Yu ZX (俞志雄) (1994) *Sinomanglietia*—a new genus of Magnoliaceae from China. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **16**, 202–204. (in Chinese with English abstract)
- Yu ZX (俞志雄), Xiao DX (肖德兴), Liao J (廖军), Zheng QY (郑庆衍), Zhang L (张露), Li ZQ (李志强) (1999) Wood structure of *Sinomanglietia* Z. X. Yu of Magnoliaceae. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **21**, 91–94. (in Chinese with English abstract)
- Zhang ZR, Luo LC, Wu D, Zhang ZY (2009) Two genetically distinct units of *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae) detected by chloroplast PCR-SSCP. *Journal of Systematics and Evolution*, **47**, 110–114.
- Zhang ZY, Wu R, Wang Q, Zhang ZR, López-Pujol J, Fan DM, Li DZ (2013) Comparative phylogeography of two sympatric beeches in subtropical China: species-specific geographic mosaic of lineages. *Ecology and Evolution*, **3**, 4461–4472.
- Zheng QY (郑庆衍) (1995) A revised name of huamulian. *Journal of Nanjing Forestry University* (南京林业大学学报), **19**, 46. (in Chinese with English abstract)
- Zink RM (2007) Ecological exchangeability versus neutral molecular markers: the case of the great tit. *Animal Conservation*, **10**, 369–373.

(责任编辑: 高连明 责任编辑: 时意专)