



2006 届研究生博士学位论文

学校代码：10269

学号：YB03165001

华东师范大学

水杉的系统发育地位及恢复评价

学 院：资源与环境科学学院

系 别： 环境科学系

专 业： 生 态 学

研 究 方 向： 分子生态学

指 导 教 师： 陈小勇教授

博士研究生： 李 媛 媛

2006 年 5 月 · 上海

University Code: 10269

Student ID: YB03165001

**Phylogenetic position and recovery
assessment of *Metasequoia
glyptostrobooides***

**A Dissertation Presented in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree Doctor of Philosophy**

By

Li Yuanyuan

Supervised by

Professor Chen Xiaoyong

East China Normal University

Shanghai, China

May, 2006

水杉的系统发育地位及恢复评价

摘 要

人类直接或间接的活动对全球环境产生恶劣影响,由此造成生物多样性大量丧失,许多物种沦为濒危状态。保护生物多样性是全球的热点问题之一,对濒危物种的保护轰轰烈烈地开展着。现今的保护措施大多只着眼于恢复濒危物种的数量,然而保护的目的是阻止濒危物种绝灭,使它们脱离濒危状态,并能够自我维持。种群遗传结构是保证物种长期适应环境变化的基础,体现了物种应对环境变化的潜力。致濒危机制的正确寻找,有助于制定相对完善的保护措施。

活化石水杉是重要的珍稀濒危植物,天然水杉只分布于我国湖北、湖南和重庆三省市交界的一小片区域,总数量只有 4000 多株。现今水杉的人工种植种群的分布范围遍及世界各地,超过化石记录的分布范围,水杉的数量也已经恢复到相当水平。但是,水杉的遗传结构是否已得到成功恢复,水杉人工种群是否具有天然更新能力,都是引人深思的问题。本研究对以上问题进行深入探讨:首先用分子生物学手段对历来有争议的水杉在杉科的系统进化地位做一探究,也为后续研究提供进化上的参考背景;然后通过种群遗传分析,比较现有水杉人工种群与自然种群的遗传结构异同,探讨人工种群遗传结构是否得到恢复;随后从繁殖过程中的种子形成和幼苗生长两个环节,探询水杉人工种群是否具有天然更新能力以及影响环节;最后通过以上一系列研究,探讨影响水杉人工种群遗传结构的因素以及自我更新能力的瓶颈,提出实用有效的保护措施,以期为珍稀濒危物种保护提供科学依据。主要结果如下:

(1)应用 4 个叶绿体 DNA 序列(trnL, trnL-trnF, trnV, petG-trnP)和 3 个线粒体 DNA 序列(atpA, Nad1, CoxIII)对杉科 9 属 15 种 1 变种进行系统发育分析,叶绿体和线粒体联合序列重建的杉科系统发育树,都一致地把杉科分为 5 族:水松属(*Glyptostrobus*)和落羽杉属(*Taxodium*)为落羽杉族;柳杉属(*Cryptomeria*)为柳杉族;台湾杉属(*Taiwania*)和杉木属(*Cunninghamia*)为杉木族;水杉属(*Metasequoia*)、巨杉属(*Sequoiadendron*)和红杉属(*Sequoia*)为红杉族;密叶杉属(*Athrotaxis*)为密叶杉族。叶绿体和线粒体都分为 5 族是一致的,但 5 族之间的亲缘关系稍有不同。线粒体是杉木族、落羽杉族和柳杉族、红杉族 4 族的关系较近,然后再是密叶杉族。而叶绿体是杉木族、红杉族、密叶杉族 3 族关系较近,然后是落羽杉族和柳杉族的组合。

(2)4 个叶绿体片段与 3 个线粒体的碱基序列变异程度明显不同,叶绿体联合序列 1168 个位点中变异位点有 88 个,占 7.53%,线粒体联合序列 1825 个位点中变异位点有 51 个,占 2.79%,叶绿体的显著比线粒体大。杉科 4 个叶绿体片段除有大量的碱基置换外,还都有部分个体连续几个或十几个甚至几十个的碱基插入缺失现象或者出现多个核苷酸重复的现象。表明线粒体 DNA 的核苷酸替换速率远远低于叶绿体 DNA 的替换速率。水杉的叶绿体 DNA 显示了比较特殊的特征,表明了水杉属进化上比较孤立的系统位置,但依然验证了水

杉与红杉、巨杉较近的亲缘关系。

(3)采用 7 个微卫星多态位点对 9 个自然种群 88 个个体进行遗传结构分析, 结果是水杉自然种群多态位点百分比平均为 57.14%, 在 7 个微卫星位点共有等位基因 19 个, 平均每位点 2.71 个等位基因, 低于其他物种的水平。种内遗传多样性(H_S)为 0.157, 同样也低于其它物种水平。表明水杉自然种群遗传多样性较低, 主要是由于冰期和人为活动两方面的影响。

(4)采用 7 个微卫星多态位点对水杉人工 4 个种群 71 个个体和自然种群遗传结构相比较, 结果表明, 水杉人工种群平均多态位点百分比为 35.72% 低于自然种群, 人工种群的遗传多样性低于自然种群, 主要与恢复方法有关, 引种时取样效应和小种群效应都会所致, 另外, 无性繁殖也导致人工种群的遗传多样性降低。人工种群的平均等位基因数目(13.25)多于自然种群(13), 但平均常见等位基因数目(10.25)却少于自然种群(11)。说明水杉人工种群有特有等位基因出现, 但频率又不大, 这种结果的出现有两方面可能的原因: 一是引种的个体含有这些等位基因, 但我们研究中的样本未包含这些个体; 二是人工种群作为自然种群后代, 有一部分基因流是由花粉贡献的, 因此后代可能比母本的等位基因丰富。人工种群的遗传分化系数 $G_{ST}=0.006$ 小于自然种群的 $G_{ST}=0.015$, 说明人工种群的遗传分化程度非常低, 他们之间有着比自然种群更加相似的遗传结构。人工种群与自然种群的比较研究结果表明, 水杉引种过程中存在种源单一而又种质混杂的问题。

(5)对野生水杉原产地两种群(桂花种群、利川其它种群)和两个人工种群(华东师大种群、黄山种群)的种子形成和幼苗生长进行比较研究, 结果是原产地两种群的种子重量和大小大于两人工种群, 人工水杉与野生水杉种子相比发芽率低, 表明水杉自然种群出产种子的质量优于人工种群。人工种群种子的相对适合度大致只相当于自然种群的 1/17 和 1/6, 而其幼苗生长过程却与自然种群几乎无差异, 说明人工水杉种子质量低导致适合度降低。人工水杉交配系统的异交率比自然种群略高, 并且人工种群和自然种群的幼苗生长的高度、基径、冠幅和侧枝数都无差异。说明种子萌发是对人工水杉种子的强烈选择过程, 人工水杉败育现象严重。对水杉种子形成和幼苗生长两个繁殖环节研究, 认为影响人工水杉种群繁殖的瓶颈, 主要是人工种植水杉种子质量低。

(6)研究显示, 尽管水杉在数量上已经恢复成功, 分布上也超过了古代水杉曾经面积, 但是人工种群的遗传结构并没有完全恢复。同时, 对水杉人工种群自我更新能力研究表明, 现有水杉人工种群本身具有繁殖瓶颈, 几乎丧失种群自我更新能力。因此, 我们认为水杉人工种群的恢复措施是: ①人工水杉种群栽培应考虑合理的密度, 以保证提供充足的繁殖力量所需的营养; ②取样时应避免种子来源单一的现象, 保持新建种群的遗传多样性; ③取样也要避免种质混杂的问题, 保持新建种群间的遗传分化程度。水杉自然种群的栖息环境、遗传结构同样受到严重威胁, 所以恢复人工种群的同时, 也要加强自然种群的保护, 建议对自然种群的保护采取人工辅助下的自然更新措施以维持自然种群的生存和繁衍。

(7)我们对水杉的保护研究表明，濒危物种的恢复不仅仅是数量恢复，遗传结构和天然更新能力也要同时恢复。在考虑濒危物种恢复计划，或者制定濒危物种从红皮书中降级(downlisting)或去除(delisting)标准时，应该考虑遗传信息和更新能力。这是保证恢复种群具有与野生种群相似的遗传变异程度的重要因素，也是新种群具有自我维持能力的保证。

关键词：保护、水杉、自然和人工种群、系统发育、遗传结构、种子形成、幼苗生长、交配系统、更新能力、SSR

Phylogenetic position and recovery assessment of *Metasequoia glyptostroboides*

Abstract

Biodiversity loss led by human activities is a global environmental problem. An unknown but large number of species are already extinct, while many others have reduced population sizes that put them at risk. The main aim of conservation is to recover threatened or endangered species to the extent they can sustain without human being's assistance. However, the main concern of the conservation focuses on the recovery of the numbers of the threatened and endangered species, and few effort has been on their genetic variation, which is critical to cope with environmental changes.

Dawn Redwood (*Metasequoia glyptostroboides*), a living fossil, is an important endangered plant species with a limited distribution around the borders of Hubei Province, Hunan Province and Chongqing Municipality in China. Great conservation efforts, including preservation of large trees in the wild, a plantation of grafted trees, and introduction of seeds and/or seedlings to other parts of China and throughout the world, have been laid since *M. glyptostroboides* being discovered in 1940s. *M. glyptostroboides* is successfully recovered in number and distribution range now, but whether the genetic structure has been recovered and whether its introduced populations can regenerate naturally are unknown. In this dissertation, firstly I determined the phylogenetic position of *M. glyptostroboides* in Taxodiaceae species based on constructing phylogenetic tree. Secondly, I compared the genetic structure of artificial populations of *M. glyptostroboides* with the natural populations' and discuss the genetic consequence of the recovery. Thirdly, the natural regeneration ability of recovered populations was assessed from seed quality and seedling growth. At last, I discussed the factors that affected the genetic structure of recovery populations and provided some suggestions on the recovery of *M. glyptostroboides*.

1. Using sequences of 4 chloroplast DNA (cpDNA) regions, including trnL IGS, trnL-trnF IGS and trnF gene, trnV gene and petG-trnP gene, as well as 3 mitochondrial DNA (mtDNA) regions, including atpA, Nad1, CoxIII gene, we explored the phylogenetic relationships of 15 species and 1 variety of 9 genera in Taxodiaceae. Five sections were classified in Taxodiaceae, i.e. section A (*Glyptostrobus*, *Taxodium*), section B (*Cryptomeria*), section C (*Taiwania*, *Cunninghamia*), section D (*Metasequoia*, *Sequoiadendron*, *Sequoia*) and section E (*Athrotaxis*). However, sections of A, B, C and D were more closely related than E indicated by mtDNA sequence, while cpDNA data indicated that A and B are closely related and C, D and E has a closely related relationship.

(2) There were 88 mutation sites in 1168 sites of cpDNA combined sequence (7.53%), while there were 51 in 1825 of mtDNA combined sequence (2.79%). Besides a number of substitutions in cpDNA, there were some insertions or indels of several to dozens of bases or poly T, A, or AT repeats in cpDNA sequence, which suggested the variation rate of nucleotide of cpDNA is much higher than that in mtDNA. Though the difference of *M. glyptostroboides* of cpDNA sequence is significant to the sequences of other species, it still provides the evidence that *Metasequoia*, *Sequoiadendron* and *Sequoia* are sister taxa.

(3) A total of 7 loci of SSRs were used among 88 individuals of 9 wild populations. The percentage of polymorphic loci, number of alleles and average alleles per loci were 57.14%, 19 and 2.71, respectively, which were lower than other plants. A lower genetic variation ($H_S = 0.157$) than other plants indicating the effects of glaciations, recent habitat loss and fragmentation led by human activities.

(4) Seven SSRs loci were used in comparing the genetic structures of 71 individuals of 4 artificial populations with that of wild populations. The percentage of polymorphic loci of artificial populations (35.72%) was lower than wild populations (57.14%). Expected heterozygosity (H_E) of artificial population (0.1424) was also lower than wild population (0.1558). Biased seed collection, small population size and asexual propagation might lead to it. Mean number of alleles in artificial population (13.25) was higher than that of wild population (13), might be the results of difference in samples for introduction and the present study, and potential higher allele in seeds via sired pollen than in maternal individuals. G_{ST} of artificial population was 0.006, also lower than that of natural populations (0.015), indicating a more similar genetic composition among artificial populations.

(5) Either weight and size or germinate rate of seeds from natural individuals were higher than that from introduced individuals, suggesting that seed quality of natural trees was better than the introduced ones. The relative fitness of seeds from introduced trees was only approximately 1/17 or 1/6 of that of natural ones, while there was no significant difference in seedling growth. Outcrossing rate of artificial population was a little higher than wild population. There is no difference in height, stem base diameter, maximum crown diameter and branch number of seedling between seedlings germinated from seeds of natural and artificial populations. Above results indicated that poor seed quality is the bottleneck limiting the regeneration of artificial populations.

(6) Our study in *M. glyptostroboides* indicates that the genetic structure of introduced populations has not been successfully recovered as the quantity and distribution did. And there was a bottleneck limited propagation of artificial population which led to the failure of natural

regeneration of the artificial populations. Thus, conservation for natural population is especial important. A human-aided natural regeneration is proposed to protect and restore natural populations. To maintain genetic variation in recovered populations, we should avoid collecting seeds from so-called “better trees”, which may lead to low diversity and inbreeding depression, as well as mixing seeds from different population, which may lead to outcrossing depression though the diversity may be increased.

(6)The present study of *M. glyptostroboides* indicated that recovery of endangered species is not merely recovering a species' numbers, but also genetic composition. Population genetics and natural regeneration should be considered in the criteria for downlisting or delisting of endangered species, given that the ultimate goal of conserving threatened and endangered species is to construct populations that maintain genetic variability and recover their ability to cope with the changing environments.

Keywords: conservation, *M. glyptostroboides*, wild and artificial populations, phylogenetics, genetic structure, seed set, seedling growth, mating system, regeneration, SSR

目 录

摘要.....	i
Abstract.....	iv
第一章 前言.....	1
1.1 濒危物种的保护.....	1
1.2 濒危物种的遗传多样性.....	2
1.3 导致物种濒危的遗传学因素及遗传恢复.....	3
1.4 濒危物种水杉的恢复.....	5
1.5 本研究的技术路线图.....	6
第二章 水杉在杉科的系统发育地位.....	8
2.1 前言.....	8
2.1.1 系统发育学的发展概况.....	8
2.1.2 系统发育学的研究方法.....	9
2.1.3 杉科(Taxodiaceae)系统发育研究进展.....	10
2.2 材料与方法.....	13
2.2.1 样品及取样地点.....	13
2.2.2 植物总 DNA 提取.....	13
2.2.3 PCR 扩增.....	15
2.2.4 测序.....	17
2.2.5 DNA 序列分析.....	18
2.3 结果.....	19
2.3.1 杉科物种的各引物 DNA 序列特征.....	19
2.3.2 系统发育分析.....	26
2.4 讨论.....	30
第三章 水杉人工种群和自然种群的遗传结构.....	33
3.1 前言.....	33
3.1.1 自然种群和半自然种群的遗传结构.....	33
3.1.2 人工种群的遗传结构.....	35

3.1.3 微卫星方法在种群遗传学研究中的应用	37
3.1.4 水杉种群遗传结构研究进展	38
3.2 材料与方法	39
3.2.1 研究材料	39
3.2.2 总 DNA 提取	40
3.2.3 微卫星分析	40
3.2.4 数据处理	45
3.3 结果	49
3.3.1 Hardy-Weinberg 平衡检验	49
3.3.2 多态位点百分数	50
3.3.3 等位基因数目	50
3.3.4 等位基因丰富度	50
3.3.5 杂合度	50
3.3.6 多态位点的固定指数	50
3.3.7 基因分化系数	52
3.3.8 遗传一致度(I)与遗传距离(D)	52
3.3.9 聚类分析	52
3.3.10 配比检验	54
3.4 讨论	55
3.4.1 水杉自然种群的遗传结构	55
3.4.2 水杉人工种群和自然种群遗传结构比较	56
3.4.3 水杉人工种群的种源	57
第四章 水杉的种子形成及幼苗生长	58
4.1 前言	58
4.1.1 植物的交配系统与近交衰退	58
4.1.2 植物的种子形成及幼苗生长	60
4.1.3 水杉的繁殖生物学特性	61
4.2 材料与方法	64
4.2.1 人工种群水杉个体的分布与年龄结构调查	65
4.2.2 花的发育与结实情况调查	66

4.2.3 种子采集·····	67
4.2.4 种子重量和大小·····	67
4.2.5 水杉种子的发芽·····	68
4.2.6 水杉种群的交配系统·····	69
4.3 结果·····	70
4.3.1 华东师大水杉的分布与年龄结构·····	70
4.3.2 华东师大水杉开花与结实情况·····	73
4.3.3 水杉种子形态特征·····	76
4.3.4 水杉种子发芽·····	78
4.3.5 交配系统·····	81
4.4 讨论·····	83
4.4.1 水杉人工种群的种子形成和幼苗生长·····	83
4.4.2 人工水杉种群的繁殖瓶颈·····	84
第五章 水杉保护建议·····	86
5.1 水杉人工种群的恢复建议·····	86
5.2 水杉自然种群的保护建议·····	87
附录·····	89
参考文献·····	90
后记·····	107

图表目录

图 1.1 本研究技术路线图·····	7
图 2.1 2 个不同物种的重复基因·····	9
图 2.2 烟草 cpDNA 的 trnL IGS 位置·····	20
图 2.3 trnL IGS 片段变异·····	20
图 2.4 烟草 cpDNA 的 trnL-trnF 位置·····	21
图 2.5 trnL-trnF IGS and trnF gene 片段典型变异·····	22
图 2.6 烟草 cpDNA 的 petG-trnP 位置·····	22
图 2.7 petG-trnP 片段变异·····	22
图 2.8 烟草 cpDNA 的 trnV 位置·····	23
图 2.9 trnV 片段变异·····	24
图 2.10 烟草 mtDNA 的 atpA 位置·····	23
图 2.11 atpA 片段变异·····	24
图 2.12 烟草 mtDNA 的 nad1 位置·····	25
图 2.13 nad1 片段变异·····	25
图 2.14 烟草 mtDNA 的 coxIII位置·····	26
图 2.15 coxIII片段变异·····	25
图 2.16 trnL IGS 序列的 50%多数一致树·····	26
图 2.17 trnL-trnF IGS and trnF gene 序列的 50%多数一致树·····	27
图 2.18 petG-trnP 序列的 50%多数一致树·····	28
图 2.19 atpA 序列的 50%多数一致树·····	29
图 2.20 叶绿体序列联合和线粒体序列联合分别建立的 50%多数一致树·····	30
图 3.1 恢复策略中物种 3 种可能来源中干扰程度与大小的关系·····	36
图 3.2 水杉的采样地点·····	40
图 3.3 水杉种群的 UPGMA 聚类·····	54
图 3.4 人工种群的配比检验·····	54
图 4.1 水杉人工种群研究地点和范围·····	65
图 4.2 华东师大水杉种群个体数在各个年龄等级的分布·····	73

图 4.3 华东师大水杉种群胸径及 2004 年和 2005 年开花及结实情况·····	75
图 4.4 每种群的平均千粒重·····	77
图 4.5 每种群种子的平均大小·····	77
图 4.6 种子大小和重量的关系图·····	78
图 4.7 水杉种子的萌发率·····	79
图 4.8 幼苗生长期 4 个种群平均高度变化图·····	80
图 4.9 幼苗基径和冠幅变化·····	80
表 1.1 濒危物种杂合度低于分类学关系相近的非濒危物种的比例及差异量·····	2
表 2.1 本研究中杉科植物的采样地点与时间·····	14
表 2.2 外类群的采样地点与时间·····	13
表 2.3 预实验使用通用引物、反应条件、扩增结果·····	16
表 2.4 引物测序时的中间测序引物序列·····	18
表 2.5 进行测序的 7 对引物 17 个个体及测序结果·····	19
表 2.6 trnL-trnF IGS and trnF gene 序列 Genbank 中序列号·····	21
表 3.1 几个植物类群等位酶的遗传变异·····	33
表 3.2 植物不同种类的遗传变异·····	34
表 3.3 水杉的采样地点·····	40
表 3.4 预实验中微卫星引物的序列及 PCR 扩增条件·····	41
表 3.5 Hardy-Weinberg 平衡检验·····	49
表 3.6 水杉 13 个种群的遗传多样性·····	51
表 3.7 Nei's 基因分化系数·····	52
表 3.8 Weir & Cockerham 的 F-统计量·····	52
表 3.9 遗传一致度和遗传距离·····	53
表 4.1 水杉雌雄花形成及开花过程·····	62
表 4.2 水杉种子和球果的发育·····	63
表 4.3 华东师大种群 15 个分区·····	65
表 4.4 胸径大小及年龄等级划分·····	66
表 4.5 水杉种子的采集地点及采集个体数目·····	67
表 4.6 实验中微卫星引物的序列及 PCR 扩增条件·····	69

表 4.7 华东师大水杉分布情况·····	71
表 4.8 各个胸径等级的个体数·····	72
表 4.9 华东师大水杉种群 2003、2004、2005 和 2006 年开花及结实情况·····	74
表 4.10 各年间球果和雄花序的 χ^2 检验·····	75
表 4.11 各区域平均胸径与雄花序和结实的相关分析·····	76
表 4.12 水杉萌发母树比例和种子萌发率·····	79
表 4.13 用于交配系统分析的个体及幼苗数·····	81
表 4.14 4 个种群的花粉库和胚珠库各位点等位基因频率·····	82
表 4.15 3 个种群的异交率·····	82
表 4.16 各种群的相对适合度·····	83

第一章 前 言

1.1 濒危物种的保护

生物的自然栖息地变成工农业用地, 最终变成退化的土地, 是人类对自然环境的主要影响, 伴随而来的是带来对生物多样性的巨大威胁(Dobson *et al.* 1997)。现今大量生物种类减少, 而且相当一部分物种濒临灭亡, 甚至有些已经灭绝。2004 年 IUCN 的红色名录显示, 全世界已经有 15589 个物种被列入濒危物种, 其中包括鸟类的 12%、哺乳动物的 23%、两栖动物的 32%以及 34%的裸子植物, 这 4 个类群达到 4475 种, 占 IUCN 红色名录的 29%(IUCN red list 2004)。好在人们已经开始认识到这些“灾难”的来临, 意识到生物多样性带给我们巨大的价值(US Fish and Wildlife Service 2005)。因此, 过去几十年里, 保护环境以及保护生物多样性的观点已经赢得许多国家政府和人民的认可(IUCN Overview)。

然而, 保护、维持并恢复物种不是件容易的事, 为此许多生物学家、投资家以及社会学家都在接受着挑战(Morgan *et al.* 2006), 政府、民间组织都做出了自己的努力。为确定优先保护的濒危物种, 世界自然保护联盟(The World Conservation Union, IUCN)根据一定的标准把处于危险状态的物种划分成不同等级(IUCN red list 2004), 并每年对红色名录(Red List Categories)中的濒危物种进行修订。红色名录的不断变长提醒我们必须加快保护濒危物种的步伐(Workman 2005)。由联合国环境规划署发起的《生物多样性公约》已于 1993 年正式生效, 公约“旨在保护濒临灭绝的植物和动物, 最大限度地保护地球上的多种多样的生物资源, 以造福于当代和子孙后代”(The Convention on Biological Diversity)。我国是签署公约的 188 个成员国之一, 于 1992 年和 1998 年相继出版了《中国植物红皮书》、《中国濒危动物红皮书》。

目前, 已对许多物种进行了保护生物学研究, 但大多数研究偏重于种群统计学方面的工作, 如 Watthana(2004)对兰科鹿角兰属 *Pomatocalpa naevara* 的开花、结果、发芽等方面做了研究, 并探讨如何进行保护; Witkowski 等(2001)做了濒危多年生草本植物 *Kniphofia umbrina* 的土壤状况、种群年龄结构方面的研究; Knowles 和 Witkowski(2000)对小型肉质植物 *Euphorbia barnardii* 进行了种群大小、种群结构、侧枝死亡情况、遭破坏和病害情况等做了研究, 并进行保护方法的探讨。Kearns 和 Inouye(1997)从传粉者主要是蜜蜂的行为与植物开花的关系角度对传粉者的保护生物学做了综述。也有为数不少的从遗传角度探讨濒危物种保护的研究, 如 Anders(2002)开展了濒危物种高手鲟(*Acipenser transmontanus*)种群的结构、遗传多样性、基因流、系统发育及其保护的工作, Holycross(2002)对两种响尾蛇 *Crotalus willardi obscurus* 和 *Sistrurus catenatus edwardsii* 的种群遗传变异格局及其保护进行了探讨。

在众多保护活动开展的同时, 保护组织一直面临着一个问题, 就是如何证实世界生物资源得到保护, 因此保护过程中的监测与评价越来越重要(Stem *et al.* 2005)。过去对生物多样性的保护与评价多侧重于物种多样性的判别标准, 对遗传学研究在保护实践中的应用一直有争议: 一方认为, 遗传特征影响种群短期和长期适应生存的潜力是众所周知的事实; 相反方认为, 物种灭绝和遗传没有直接的稳固关系, 其它更加直接关联的方面, 如种群统计特征、种群动态等, 应该比遗传学优先考虑(Moyle *et al.* 2002)。许多学者认为物种通常在遗传因素还未来得及对其产生影响时就已经趋于灭绝, 然而几乎没有研究真正地证明过这种情况(Spielman *et al.* 2004)。

1.2 濒危物种的遗传多样性

生物多样性的三个方面，即遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性是相辅相成的。一方面，任何一个物种都具有其独特的基因库和遗传组织形式，物种的多样性就显示了遗传多样性(葛颂，洪德元 1994)。遗传多样性是生物多样性中一个重要组成部分，它是物种多样性和生态系统多样性的前提和条件。另一方面，物种是构成生物群落进而组成生态系统的基本单元，生态系统多样性离不开物种的多样性，也就离不开物种所具有的遗传多样性(葛颂，洪德元 1994)。生物进化的基础是遗传变异，因此遗传多样性的高低反映物种的进化潜力，遗传结构是保证物种长期适应环境变化的重要因素(Frankham 1995, 陈小勇 2000, 张志勇，葛颂 2005)。低遗传多样性意味着濒危物种繁殖适合度的降低以及灭绝风险的增加(Frankham *et al.* 2002, Spielman *et al.* 2004)，大量研究表明，如果遗传因素对物种不起负作用，大部分物种都不会趋向灭绝(Spielman *et al.* 2004)。

遗传多样性丧失对物种产生严重危害的问题，直到 1970 年北美农庄的一场大灾难发生人们才真正意识到，这场灾难给人们以严重的警示。当时叶枯病席卷整个北美的玉米，导致巨大经济损失。在所有办法都无法制止导致叶枯病病菌肆虐的时候，科学家们发现一种野生玉米种能够抵抗它们。通过野生种与栽培种杂交创造了抗性品种，拯救了数千农场免遭毁灭性破坏。后来研究发现美国境内 70%的玉米对这种病菌有相同的遗传易感性(genetic susceptibility)，从此唤起了全世界对作物遗传多样性的保护(Mann 1997)。

濒危物种通常存在小的和(或)呈下降趋势的种群大小，由此不可避免的导致近交衰退和遗传多样性丧失(Frankham *et al.* 2002, Spielman *et al.* 2004)。Frankham(1995)对 38 个濒危物种(包括哺乳动物、鸟类、鱼、昆虫和植物)与其相应的非濒危近缘种遗传多样性对比分析中得出结论，32 种濒危物种的多样性都相对低，5 个有与其非濒危近缘种相似的遗传多样性，只有一个高于近缘种。同样，Spielman 等(2004)在对 170 个濒危物种与其分类学上关系相近的非濒危物种的杂合度进行了比较(表 1.1)，有 78%濒危动物的杂合度低于相应的非濒危近缘种，濒危植物有 75%低于相应的非濒危近缘种，总体上大部分濒危物种(77%)的遗传多样性低于其相应的非濒危近缘种。

表 1.1 濒危物种杂合度低于分类学关系相近的非濒危近缘种的比例及差异量(Spielman *et al.* 2004)
Table 1.1 Percentages of threatened taxa with lower heterozygosity than taxonomically related nonthreatened taxa ($H_t < H_{nt}$) and the magnitudes of those differences (Spielman *et al.* 2004)

种类	$H_t < H_{nt}$, %	中数差, %	平均值差, %	n	p
Taxon		Median difference, %	Mean difference, %		
所有物种	77	40	35	170	<0.0005
动物	78	38	35	134	<0.0005
脊椎动物	78	35	35	129	<0.0005
恒温动物	81	43	40	94	<0.0005
哺乳动物	84	46	42	63	<0.0005
鸟类	74	40	35	31	0.001

变温动物	69	26	20	35	0.001
无脊椎动物	80	67	37	5	0.140
植物	75	57	38	36	<0.0005
被子植物	81	58	40	21	0.005
裸子植物	67	51	35	15	0.012

注：n 表示濒危种类的数量，p 是基于 Wilcoxon 符号秩检验的概率。

举世瞩目的濒危物种大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是遗传多样性低的典型例子。对大熊猫的 36 种血液同工酶及蛋白质电泳发现,来自 8 个山系及其配种后代的 12 只大熊猫只有一个位点是两个等位基因,遗传多样性极低。而同样实验条件下的 17 只亚洲黑熊(*Selenarctos thibetanus*)却有丰富的遗传多态性(宿兵等 1994)。濒危物种水松(*Glyptostrobus pensilis*)的分布仅限于中国南部和越南。研究显示种群水平和物种水平的遗传多样性都极低,不同地区种群间的遗传分化非常大(Li & Xia 2005)。在秘鲁和安第斯山脉生长着大型植物葛氏普亚凤梨(*Puya raimondii*)是当地的乡土种也是濒危物种,它的分布范围很窄。AFLP 和 cpSSR 标记都证明该凤梨种群极低的遗传多样性和极高的种间遗传分化(Sgorbati *et al.* 2004)。木根麦冬(*Ophiopogon xylorrhizus*)是我国的珍稀濒危植物,分布仅限于云南西双版纳雨林,遗传多样性同样很低(Ge *et al.* 1997),并且比与具有相似生活史的同属广布种 *Ophiopogon intermedius* 的遗传多样性低很多(He *et al.* 2000)。不过,由于存在相对大量的产种率、基因流、以及生活史特征等等因素,濒危物种也可能保持比较高的遗传多样性,这在鸢尾科植物 *Iris aphylla* (Wroblewska *et al.* 2003)和兰科濒危物种 *Pseudorchis albida*(Reinhammar *et al.* 2002)中都有所报道。

在恢复过程中遗传学能够起重要的作用,它可以提供促进物种持续生存的保护和繁育策略的信息,包括遗传多样性的保护以及减少近交和远交衰退的威胁等等(Hedrick & Kalinowski 2000)。人们已经逐渐意识到保护与恢复过程中遗传因素的重要性(McNeely *et al.* 1990, Li *et al.* 2005, Frankham 2005)。所以,尽管一些保护生物学家认为,现代物种灭绝的第一位原因是确定性的人为因素,尤其是生境丧失、生境破坏以及过度利用对物种生存威胁最为严重,遗传学概念和技术对物种保护的作用非常有限(Lande 1988),但是遗传学在保护生物学中应用的兴趣在最近的 20 年里还是大大提高了(Stem *et al.* 2005)。基因型多样性促进生态系统的恢复已经得到证实(Reusch *et al.* 2005)。对克隆的方法拯救受威胁的物种提出置疑(Cohen 1997)也是出于对遗传多样性的重视。Stinchcombe 等(2002)建议众多保护生物学的研究的开展应该注重能否应用于实践之中。

1.3 导致物种濒危的遗传学因素及遗传恢复

对濒危物种遗传组成实施保护的关键在于对致濒危机制的了解,物种走向濒危乃至灭绝是确定性因素和不确定性因素的综合作用结果,尽管当前物种灭绝的第一位原因是确定性因素,如生境丧失、过度利用、污染、迁入物种等,但对于一些特定类群,遗传上的随机因素,在物种濒危灭绝过程中的作用仍然是不可忽视的,在某些情况下还起到决定性作用(张志勇,葛颂 2005)。一旦濒危物种种群下降、变小,它们就会遭到遗传多样性的丧失、近交

衰退(后果是繁殖适合度下降)以及有害等位基因的积累, 这些因素都会提高灭绝的风险(Frankham *et al.* 2002)。

近交是亲缘关系很近个体间交配, 后果是产生的后代比自由交配产生的后代在适合度上降低, 导致近交衰退(Hedrick 2001), 是管理和保护濒危物种中应主要考虑的问题(Hedrick & Kalinowski 2000)。当濒危物种种群有效大小被改变随之而来的是近交, 它们的遗传变异也会相应降低(Frankham 1995)。近交的后果主要表现为降低适合度, 不过由于适合度的降低取决于物种或种群的遗传结构以及基因型和环境相互作用方式, 因此适合度降低的程度变化很大(Hedrick & Kalinowski 2000)。近交积累的有害变异在小种群中导致繁殖适合度的降低(Frankham 1995)。Lande(1994)曾经预测当中度有害变异在种群中积累到有效种群的 1000 个或更多个体时, 将会比统计随机性对灭绝的影响更大, 和环境随机性影响程度相似。Keller 和 Waller(2002)最近指出, 近交和近交衰退对野生种群的影响可能比以前认识到的更加广泛深入, 是种群生存的重要威胁。不过, 如果种群间保持较高的异交率, 可以增加濒危物种的遗传多样性, 这在一种桉树 *Eucalyptus morrisbyi* 中得到证实(Jones *et al.* 2005)。

防止小种群近交最有效的途径是从其它种群迁入个体(Frankham 1995), 传入的基因流可以恢复遭受有害等位基因固定的种群的适合度(Hedrick & Kalinowski 2000)。对佛罗里达美洲狮(*Felis concolor coryi*)的遗传恢复是个很好的例子。佛罗里达美洲狮残留种群小, 在遗传漂变作用下, 多样性降低, 纯合度增加, 许多位点固定(或接近固定在)一个等位基因上, 它有一系列以前少见的有害特征, 比如隐睾症、精子质量低、弯尾及撮毛现象等, 这些特征在佛罗里达美洲狮种群中存在频率很高, 但在其它美洲狮亚种中却不常见。另外, 微卫星标记也证明佛罗里达美洲狮种群遗传变异低于其它美洲狮亚种种群, 并且其现存种群比 1900 年的标本遗传变异也低。根据这种情况, 一种保护方案就是引入其他种群的个体, 增加与其他种群的基因流。1995 年启动了遗传恢复计划, 从临近的德克萨斯引入了 8 头母豹, 其中 5 头与当地豹群生下了小豹。产下的 14 只小豹中, 没有一头有弯尾现象, 其他有害性状的频率也极大地降低(Hedrick & Kalinowski 2000)。草原榛鸡(*Tympanuchus cupido pinnatus*)在美国伊利诺斯州的残留种群提供了另一个遗传恢复的例子。它的种群从 1962 年的约 2000 只个体下降到 1994 年的不到 50 只(Westemeier *et al.* 1998)。与其它州的种群和当地历史样本比较, 现有伊利诺斯州种群的适合度和遗传变异都低。1992 年, 从其它州的大种群中引入了 271 只个体后, 对筑巢的检测结果表明该种群的生育率和孵化率都有所恢复(Bouzat *et al.* 1998)。

另外, 遗传漂变看似对种群遗传组成影响很小, 但是在小种群中, 由于配子的随机取样, 遗传漂变会对其进化和生存产生重要影响, 主要有 3 个后果: 等位基因频率在上代和下代之间随机变化、遗传多样性丧失和有害基因的固定、片断化种群间的分化等(Frankham *et al.* 2002)。在自由交配的小种群中, 如许多濒危物种, 因为遗传漂变的累积作用, 所有的个体都遭受近交衰退, 结果是降低了种群中所有个体的适合度(Hedrick & Kalinowski 2000)。辐射松(*Pinus radiata*)只在加州和墨西哥存在 5 个分离的自然种群, 墨西哥的 1 个岛屿种群推测为很久以前大陆种群扩散而来。Karhu 等(2006)对其 5 个种群进行微卫星的实验表明岛屿种群与其它大陆种群遗传分化较大, 并且比大陆种群较共同祖先的基因库有更大的分化。他们认为是岛屿小种群的遗传漂变所致。Chung 等(2004)通过对杜鹃兰(*Cremastra appendiculata*)的克隆结构研究建议, 对这类物种的长期生存力的保护应该基于对它们克隆结构深入了解的

基础上进行,因为当遗传漂变发生时,种群的遗传多样性和适合度降低,克隆结构能够反映这种降低的灵敏性。防止植物生境片段化,尽量减少种群变小的概率,一定程度上可以减弱遗传漂变对种群的影响(Frankham *et al.* 2002)。

还有,有限的基因流在自然种群中会产生显著的遗传结构,比如种群内和种群间基因型和等位基因的空间组成分布(Ishihama *et al.* 2005),因此了解基因流在进化中的作用,个体的迁移情况,以及随之发生的种群间基因的转移,是管理濒危物种的关键(Frankel & Soule 1981)。Fabiani 等(2003)通过对海象(*Miroinga leonina*)的研究,认为在一夫多妻或一妻多夫的交配系统格局的物种中,只要有少量的基因流交流,就有达到种群遗传结构相似的潜力。不过在着手人工提高基因流计划之前,了解基因流的速率和种群间的生态差异是必要的(Storfer 1999)。

最后,物种间的杂交有可能导致后代生活力和繁殖能力下降,这就产生了远交衰退现象。远交衰退破坏局部适应性而导致种群生存能力降低(Fenster & Galloway 2000)。远交可以使濒危种的特有基因进入常见种内,但濒危种自身面临灭绝的危险。非常显著的例子是美国南加州海域的一个岛屿上生长的短叶紫杉(*Cercoparpus traskiae*),它的最后一个种群只剩下 11 个个体。Rieseberg 等(1995)通过 RAPD 和等位酶技术检测它们的遗传变异,发现这 11 株大树中有 5 株是杂种个体。而且,母树周围的幼苗,经分析发现基本上也是种间杂交产生的。

1.4 濒危物种水杉的保护

水杉(*Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng)隶属杉科(Taxodiaceae)水杉属(*Metasequoia* Miki ex Hu et Cheng)(胡先骕,郑万钧 1948),是世界上珍稀的孑遗植物。在水杉发现以前,人们普遍认为它已经在第四纪冰川时期绝灭,最早在格陵兰中生代白垩纪至第三纪距今约六千万至一亿年的地层中发现它的化石。但是当时研究美国红杉的权威人士 Chaney 在对水杉的化石标本鉴定时,认为这是红杉的早期类型(Chaney 1948)。1941 年日本 Miki 博士通过对水杉化石和红杉在球果的鳞片排列方式以及着生位置方面做比较,认为二者有较大区别,从此建立了水杉的化石属名 *Metasequoia*。后来,我国科学家在现湖北省利川市谋道镇发现了第一棵水杉树引起了众多科学家的关注,经多方鉴定,1948 年胡先骕和郑万钧(1948)正式为水杉定名并公布于世。水杉的发现是 20 世纪植物学界最重大的发现之一(马金双 2003),水杉也因此被誉为“活化石”植物。

水杉是极具重要的科研、经济和文化价值的稀有濒危物种。早在 1982 年我国国家环保局公布的第一批《中国珍稀濒危保护植物名录》中被列为 8 种国家一级重点保护植物之一;1992 年,国家林业部公布的第一批《国家珍贵树种名录》中又被列为一级监管树种;在国务院 1999 年 8 月 4 日批准的《国家重点保护野生植物名录(第一批)》中被列为一级保护植物;2002 年 8 月在武汉中国地质大学召开的“首届国际水杉会议”呼吁加强对水杉原生种群及其栖息地生境的保护、恢复与科学研究;2004 年出版的《中国物种红色名录》中,因其“分布地点少于 5 个,占有面积少于 500km²”被列为濒危物种(汪松,解焱 2004)。

水杉自发现后,保护工作受到各级政府的重视。1948 年 5 月,在南京中央博物院正式成立“中国水杉保存委员会”。同年 7 月筹设“川鄂水杉保护区”。新中国成立后,将水杉列为国家一级保护树种。1974 年国家在湖北省利川县水杉坝建立了“水杉管理站”,1982 年湖

北省设立了利川小河水杉省级保护点，2001 年 10 月，湖北省恩施土家族、苗族自治州人民政府，将星斗山自然保护区与小河水杉保护点合并成新的星斗山自然保护区，同时设立了湖北星斗山自然保护区管理局。2003 年 6 月 9 日，国务院正式颁发文件批准建立“湖北星斗山国家级自然保护区”。

水杉引种工作自其发现后就在我国各地区及世界各国陆续开展起来。1946 年秋采到第一批水杉种子后，首先分赠给重庆、成都、武汉、南京、北平、广州、庐山等地的植物园或园林场及有关科研单位试种，都取得较好效果(张卜阳 2000, 王希群等 2005)。1947 年底，在水杉新种正式公布之际，我国科学家把水杉种子寄给了美国哈佛大学阿诺德树木园、加州植物园、丹麦哥本哈根植物园、荷兰阿姆斯特丹植物园、印度 Dehra Dun、爱尔兰伯尔城堡(Birr Castle)等地，并由阿诺德树木园工作者把水杉种子分发给欧美各地(马金双 2003)，水杉在我国和世界各地广泛栽种起来。长江中下游地区是水杉大量引种地，水杉在这里生长最旺盛，已成为农田防护林、公路铁路林的重要树种，也是城镇庭院绿化，村旁、路旁、水旁、宅旁植树造林的主要树种，在保护生态环境中起到重要作用。

从水杉的数量和分布范围来看，已经成为世界上恢复最成功的濒危物种之一。但是，水杉恢复过程中几乎未从遗传学角度考虑。所以，现有大面积的水杉人工种植种群是否存在遗传多样性低的状况？遗传结构是否恢复到自然种群的水平？人工水杉种群能否适应长期的环境变化？人工水杉种群能否自我更新？水杉是否已得到成功恢复？等等问题都引起人们深思。初步研究表明，水杉野生种群由于人为干扰、生境被占、演替压力等因素，处境艰难，面临消失的危险(李媛媛 2003)；人工水杉种群又表现出遗传多样性较低，且与野生水杉种群存在明显的遗传分化(Li *et al.* 2005)等诸多不利生存的现象。因此，迫切需要进一步对水杉恢复种群的遗传结构和自我更新能力进行深入研究。本研究首先对历来有争议的水杉分类地位入手，利用 DNA 序列探讨水杉在杉科的系统发生位置，为后续研究提供进化上的参考背景。然后通过种群遗传分析，比较现有水杉人工种群与自然种群的遗传结构异同，探讨人工种群遗传结构是否得到恢复。早期引种的水杉树已经到繁殖的生理年龄，但我们对人工种群的调查中未发现水杉树周围有新生的苗出现，反映出人工栽培的水杉种群自我更新能力有问题，我们从繁殖过程中的种子形成和幼苗生长两个环节，探询水杉人工种群是否能够自然更新。最后通过以上一系列研究，探讨影响水杉人工种群遗传结构的因素以及自我更新能力的瓶颈，提出实用有效的保护措施，期望为珍稀濒危物种制定纳入与删除标准提供参考。

1.5 本研究的技术路线图

本研究的技术路线图如下，首先了解水杉在杉科的系统发育地位，在此基础上，从遗传结构和天然更新能力两方面对水杉恢复进行评价。遗传结构分析选取自然种群和人工种群，采用 SSRs 标记对种群内的遗传多样性和种群间的遗传分化程度进行对比分析，在结果基础上探讨影响因素。更新能力也选取自然种群和人工种群进行对比分析，从种子的形态特征、种子萌发和交配系统 3 方面开展实验工作，在此结果基础上探讨水杉恢复种群的天然更新能力。最后对水杉恢复进行评价，提出相应的保护和恢复措施。

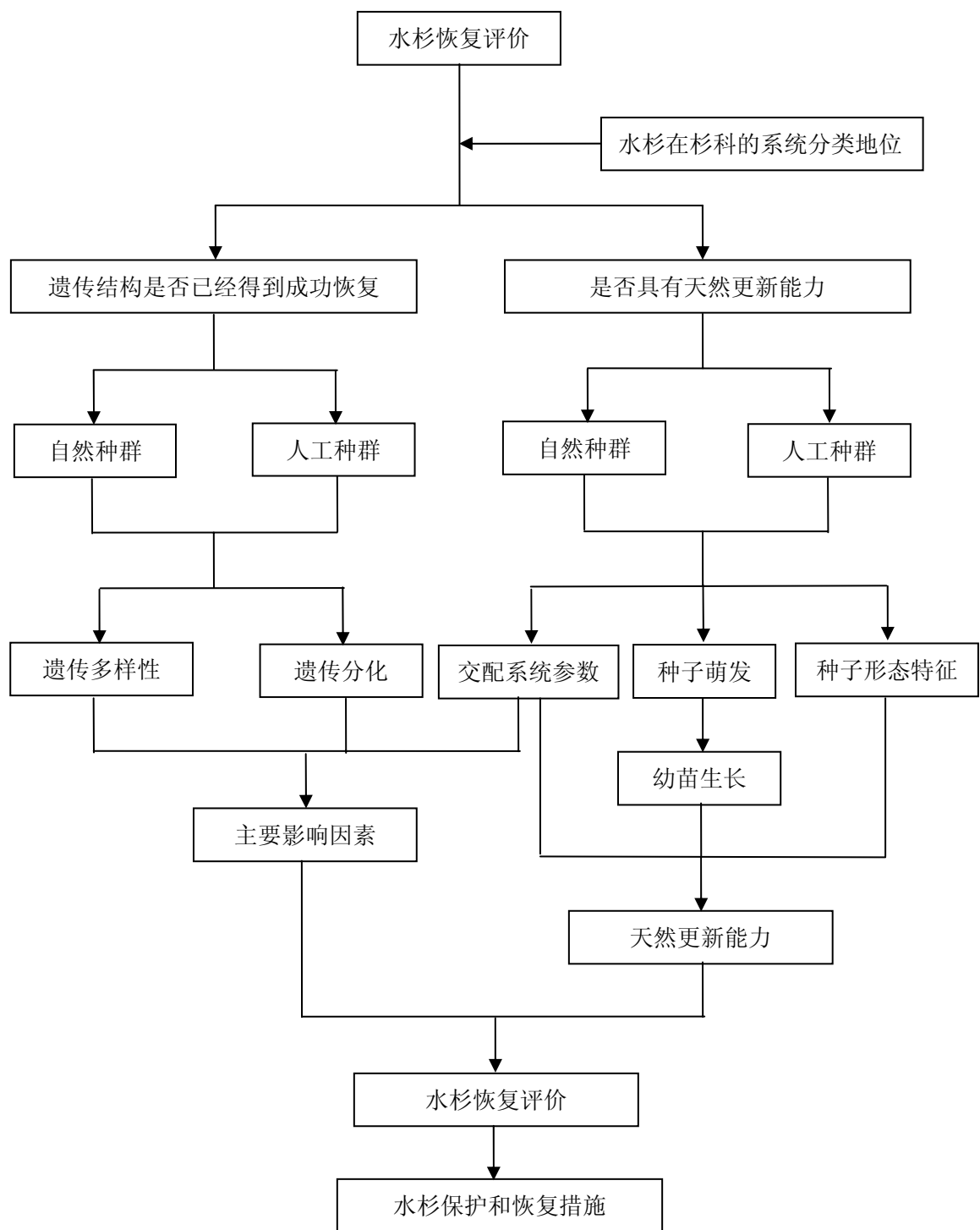


图 1.1 本研究技术路线图
Figure 1.1 Task flow chart in this study

第二章 水杉在杉科的系统发育地位

2.1 前言

2.1.1 系统发育学发展概况

系统发育学(phylogenetics)是德国昆虫学家 W. Hennig 于 1950 年提出的,用于探索不同有机体间系谱关系。基于 Hennig(1966)提出的原理建立起来的严谨的系统重建理论对分类学的发展非常重要,它为分类学领域提供了一个概念基础(Doyle 1993)。

早期的系统发育分析是依赖于一些表型特征(形态学、生理学、行为学)和古生物学的记录(Luciano 2001),但发展起来的某些统计方法至今仍然用于分子数据的系统发育分析(Nei & Kumar 2002)。最近一些年来,随着各种分子手段飞速发展,利用分子数据对系统发育学的研究也稳固地提高着,具体表现在系统发育研究的数量、规模和范围方面(Sanderson & Shaffer 2002)。

系统发育不只是应用于解决分类学问题,对 DNA 或蛋白质序列的系统发育分析已成为研究各种生物进化历史的重要工具,这类研究包括从细菌至人类许多类群(Nei 1996)。进化的第一原因是基因突变(Nei & Kumar 2002),而且不同的基因或 DNA 片段的进化速率存在较大差异,所以我们可以通过这些基因或 DNA 片段来研究几乎所有分类水平上有机体(包括界、门、纲、科、属、种和种内个体)的进化关系(Nei 1996)。

分子钟的观点深深地影响着当今人们对进化历史中重要事件的发生时间的概念(Arbogast *et al.* 2002)。分子钟假说是 20 世纪 60 年代提出的,该假说认为基因和基因产物的进化都是在时间和进化家系中以一个大致恒定的速率进行的(Zuckermandl & Pauling 1965)。有了这个假设,就可以利用分子数据来估计物种的分歧时间,就可以用来进行系统发育分析了。由于不同的基因或 DNA 片段的进化速率不同,在利用分子钟研究中,存在 3 类处理方法(Rutschmann 2006):一是用分子钟和总体统一的替换速率的方法;二是对异质性速率进行矫正的方法;三是整合异质性速率的方法。不过系统发育的研究中,DNA 序列进化的非常复杂,因此估计分歧时间也是个非常复杂的过程(Arbogast *et al.* 2002)。

系统发育学的核心在于建立单系类群(monophyletic group),只有单系类群才能用于分析。单系类群是指具有共同祖先和从共同祖先派生的包括所有种的分类群(Bechly 2005)。具体到基因上,当研究的基因属于一个多基因家族时的会出现下面的情况(Nei & Kumar 2002)。假定 2 个相关物种(比如物种 1 和物种 2),各有 2 个基因,分别为 a1、a2、b1、b2。这些重复基因是通过 2 个物种分歧前的基因重复产生的(图 2.1)。这种情况下,来自不同物种的基因 a1 与 a2 或者 b1 与 b2 被称为直源同源基因(ortholog),而基因对 a1 和 b1, a2 和 b2, a1 和 b2, 以及 a2 和 b1 被称为并源同源基因(paralog)。为了构建一个不同物种的系统发育树,我们应当使用直源同源基因而不是并源同源基因,因为只有直源同源基因代表成种事件。

系统发育研究一直以来是研究的热点,尤其是分子研究方法出现后系统发育的研究更是如火如荼。2003 年被子植物系统发育研究组(angiosperm phylogeny group, APG)用 DNA 序列重建了基于目和科水平的被子植物分类系统,在被子植物下建立了单子叶植物(monocots)和真双子叶植物(eudicots)两大类,真双子叶植物类下又建了蔷薇类(rosids)、菊类(asterids)等类群(APG 2003)。对植物某个类群的系统发育分析也有专门阐述,如 1998 年 Bateman 等人对

陆地植物的系统发育研究做了综述，Doyle(1998)对维管植物的系统发育做了专门的综述。对系统发育学与其它领域的关系也有所研究，如 1999 年 Weller 和 Sakai 论述了系统发育方法在研究植物繁育系统进化方面的应用情况，2002 年 Webb 等人论述了系统发育和群落生态学的关系，阐述了三种把系统发育信息整合到群落组成研究中的方法：调查群落组成的系统发育结构；探索群落小生境结构的系统发育基础；以及把群落学的内容融合到进化特征和系统地理学的研究中。

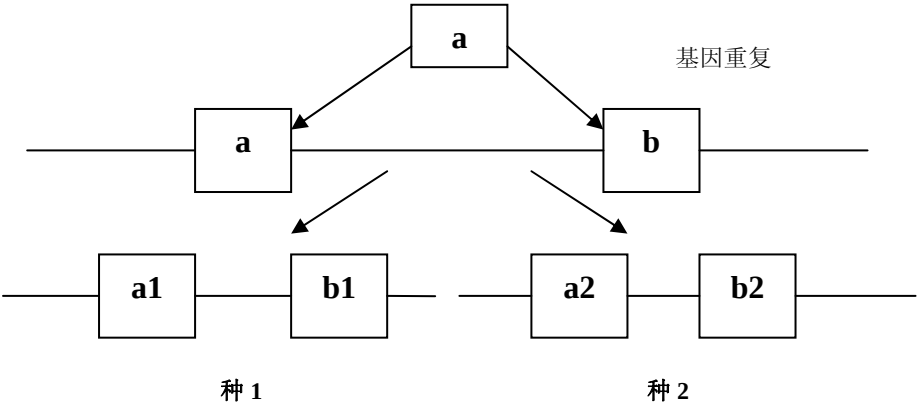


图 2.1 2 个不同物种的重复基因。基因 a1 与 a2 或者 b1 与 b2 被称为直系同源基因，而基因对 a1 和 b1，a2 和 b2，a1 和 b2，以及 a2 和 b1 被称为旁系同源基因(Nei & Kumar 2002)。

Figure 2.1 The replicated genes of two different species. a1 and a2, b1 and b2 are ortholog, respectively. And a1 and b1, a2 and b2, a1 and b2, a2 and b1 are paralog(Nei & Kumar 2002).

2.1.2 系统发育学的研究方法

随着 20 世纪 60 年代遗传学问题从分子基础上得到阐明以及各种分子生物学技术的发展，研究系统发育的各种各样的操作方法发展并成熟起来，这极大地丰富和改进了其原始思路。众多原核生物、真核生物和细胞染色体的分子序列数据的快速积累，为剖析进化关系提供了新的机遇和前景(Luciano 2001)。人们能够利用大量的分子数据(如等位酶数据、限制性酶数据、核苷酸和氨基酸的序列数据等等)，可以采取更有效的手段分析类群间的关系。

2.1.2.1 距离法

非加权组平均法(unweighted pari-group method with arithmetic means, 简称 UPGMA)是一种较常用也较简单的聚类分析方法，最早是用来解决分类问题的。当用来进行系统发育分析时，其假定的前提条件是：基因替代速率恒定。用基因频率数据重建系统发育树时，这种方法比其它距离法能构建出更好的树(Nei *et al.* 1983b)。尽管当基因替代率不稳定且所用基因或核苷酸数目较小时，经常会出现拓扑学误差，但 UPGMA 仍可用于重建物种树(Nei & Kumar 2002)。

1987 年 Saitou 和 Nei 基于最小进化原理(minimum evolution method)，提出了一种有效的方法——邻接法(neighbor-joining method, 简称 NJ)。邻接法并不检验所有可能的拓扑结构，但在每一阶段诸物种聚合时，都要应用最小进化原理。在重建系统发育树时，它取消了 UPGMA 法所作的假定，认为在进化分支上，发生趋异的次数可以不同(Nei & Kumar 2002)。

2.1.2.2 最大简约法

最大简约法(maximum parsimony method, 简称 MP)最早是基于形态性状研究的需要而发展起来的,因使用的算法不同有着许多版本,其中有些已被广泛地用于分子进化研究中对离散特征数据的系统发育树的重建,如对 DNA 序列数据分析(Sourdis & Krimbas 1987)。最大简约法是假设 4 种核苷酸(或 20 种氨基酸)可突变为与自身不同的任何一种(即所有方向),这样对于一给定的拓扑结构,可以推断每个位点的祖先状态。对这一拓扑结构,可以计算出用来解释整个进化过程所需核苷酸(或氨基酸)的最小替代数目。对所有可能正确的拓扑结构进行这种计算并挑选出所需替代数的最小拓扑结构作为最优系统树(Nei & Kumar 2002)。

2.1.2.3 最大似然法

最大似然法(maximum likelihood method, 简称 ML)中,以一个特定的替代模型分析既定的一组序列数据,使所获得的每一个拓扑结构的似然率均为最大,挑出似然率最大的拓扑结构选为最终树。所考虑的参数不是拓扑结构而是每个拓扑结构的枝长,并对似然率求最大值来估计枝长(Nei & Kumar 2002)。

2.1.2.4 不同建树方法的优缺点

不同的建树方法各有优缺点,也各有最适的应用范围,但没有绝对的界限,选择时应依据具体情况而定。不过,Brocchieri(2001)指出利用 RNA、DNA 或蛋白质序列进行的系统发育分析经常会有互相矛盾的结果出现。产生这些矛盾的原因可能是对同源特征鉴别上的模糊性、不同建树方法对不同进化速率的敏感性、物种取样的偏差、代表长枝或快速进化的系统发育信息的缺失以及用来推断系统发育关系的假设和近似情况存在困难等(Brocchieri 2001)。另外,不同的数据所建系统发育树不一致的现象也是系统发育学面临的一个挑战(Rokas *et al.* 2003)。

大多数方法采用单个大分子的序列作为标准,在相应物种中寻找同源序列,比较差异,以此建立系统树(Felsenstein 1982)。还可以选择多个基因序列建树,能够更好地减小误差,更接近真实的物种进化顺序。常用是将所选序列直接连在一起,作为一个单个大分子进行处理,得到系统发育树,运用联合分析可以提高重建系统发育树的准确性(Cunningham 1997, 施苏华等 2003)。但对于系统发育研究中不同的数据能够分开分析或是联合分析,以及是否能够同时分析的问题一直在争论不休(Queiroz *et al.* 1995)。单个基因或少量的联合基因建树都容易得到有争议的树,一般认为越多的基因联合得到的结果可信度越高。最近,Rokas 等(2003)以酵母 8 个种为例,用了 106 个基因进行独立的和联合的分析。单独一个基因或者少量的联合基因序列分析得到的树存在互相矛盾的拓扑结构,相反,全部基因联合只得到一棵树,并且分支都有最大的支持率。当最少使用 20 个基因时也得到与全部基因联合建树相类似的结果。除以上方法外,还可以采用整个基因组进行建树(Wolf & Rogozin 2002)。

2.1.3 杉科(Taxodiaceae)系统发育研究进展

杉科起源于早侏罗纪或晚三叠纪,其各种类型很可能在早白垩纪甚至晚侏罗纪就已分化出来。起源地位于东亚,在当时劳亚古陆尚未完全解体、气候分带现象尚不明显的情况下跨越欧亚大陆散布到北美,并扩散到南半球(于永福 1995)。杉科植物目前处于衰退状态,但在地质史上却曾经经历过极其繁盛的时代。在中生代中晚期和早第三纪,杉科植物种类繁多,

广布于北半球，向北扩散到北极圈内的高纬度地区，是当时的大科。杉科在白垩纪的多样性达到鼎盛，具所有的现代属和大量的化石器官属，但在以后漫长的历史发展过程中，由于地质变迁、气候变化，大量类群绝灭。晚第三纪全球性的气温下降迫使杉科逐渐从高纬度地区撤出。第四纪冰期气候的剧烈恶化使杉科分布区进一步显著退缩至中、低纬度地区，最后在欧洲全部消失，仅在东亚、北美及澳大利亚的少数几个植物“避难所”中残存下来(于永福 1995)。

杉科原有 9 属 14 种(郑万钧, 傅立国 1978)，分别是金松属(*Sciadopitys*)、柳杉属(*Cryptomeria*)、水松属(*Glyptostrobus*)、落羽杉属(*Taxodium*)、水杉属(*Metasequoia*)、红杉属(*Sequoia*)、巨杉属(*Sequoiadendron*)、杉木属(*Cunninghamia*)、台湾杉属(*Taiwania*)。后于永福(1994)认为杉科现有 9 属 12 种 3 变种，比郑万钧和傅立国(1978)少了金松属，加入了密叶杉属(*Athrotaxis*)，并且属间种有些变化，并认为柳杉是日本柳杉的变种，池杉是落羽杉的变种，台湾杉木是杉木的变种。

杉科各属主要分布于环太平洋地区极为狭窄的局部范围，在分布区内呈现出孤立或星散的残遗分布式样。落羽杉属(分布自美国东北部至佛罗里达州至墨西哥)、杉木属(从中国北部至台湾省)、台湾杉属(中国南部省以及缅甸北部)和柳杉属(分布于中国和日本)都是广泛分布的属。其他的属，红杉属和巨杉属分布于美国的西北部，南半球只分布有 1 属(密叶杉属)，在澳大利亚的塔斯马尼亚州。中国分布着特有属——水杉属和水松属，二者都是单型属，为中国特有树种。杉科现存各属均为古老的孑遗或残遗类群(于永福 1994)。

杉木属原先只有 2 种和 2 栽培变种(郑万钧, 傅立国 1978)，包括杉木(*C. lanceolata*)和台湾杉木(*C. koniabei*)，另外灰叶杉木(*C. lanceolata* cv. *glauca*)和软叶杉木(*C. lanceolata* cv. *mollifolia*)是两个栽培变种。德昌杉木(*C. unicandiculata* DY.Wang et HL.Liu)是 1982 年在四川凉山自治州德昌县境内海拔 1950 米处发现的杉木属的一个新种，分布面积很小(王德银, 刘和林 1982)。同年，德昌杉木的变种米德杉木(*C. unicandiculata* var. *pyramidalis*)被发现，分布较德昌杉木广，主要在德昌、米易两县(王德银, 刘和林 1982)。徐炳声和方永鑫(1986)对德昌杉木和米德杉木德胞核学研究认为这两种植物不足以单独列种，主张把杉木分为三个亚种：杉木亚种、台湾杉木亚种、米德杉木亚种，米德杉木可再分为米德杉木和德昌杉木两个变种。通过分子遗传标记(RAPD)以及通过对杉木种源试验的研究都表明将德昌杉木单独列为新种是不确切的，应将其认定为杉木种下的一个地方种(洪菊生 1994, 尤勇 1998)。

由于杉科和柏科(*Cupressaceae*)较近的亲缘关系，对两科的划分及亲缘关系的研究一直是热点。传统上，依据形态解剖结构上的差异将杉科和柏科作为各自独立的科，但这种独立又在形态学和次生化合物某些方面(Eckenwalder 1976, Hart 1987)，以及免疫学数据上(Price & Lowenstein 1989)被质疑。近年来，越来越多分子水平上的研究成果也支持将杉科和柏科合并为一个科。1994 年，Brunsfield 等对叶绿体 *rbcL* 区域的研究揭示了杉科和柏科的系统发育关系，他们的研究结论是：杉科和柏科为一单系群，杉科的主要类群首先分化出来，柏科是产生于杉科的一个分支。Tsumura 等(1995)用 PCR-RFLP 方法分析了叶绿体 DNA 6 个基因(*trnK*, *rbcL*, *psbA*, *pabD*, *trnK*, 16S rDNA)限制性内切酶酶切片段的长度多样性并构建了系统发生树，其结果与 Brunsfield 等的分析相似，证实了杉科和柏科很近的亲缘关系。2000 年 Gadek 等基于 *matK* 基因和 *rbcL* 基因分析了两科的所有属，比较全面地阐明了各属之间的关

系：即杉科和柏科为单系群，在这一单系群中，杉科各属首先分离出来，柏科又为一单系群，与杉科成姊妹群的关系。国内李春香和杨群(2003)用核基因 28S rDNA 序列对杉科和柏科进行系统发育分析，也支持将杉科、柏科合并为一个科——广义柏科的观点，并且对杉科、柏科的系统发生关系做了总结(李春香，杨群 2002)。

还有一个比较有争议的属——金松属(*Sciadopitys*)，传统分类上把它归为杉科，但其叶子和短枝的形态上以及在染色体数目和染色体组型上与杉科和柏科植物都有非常大的差异，并且在胚胎学、解剖学和免疫学数据上也都与两科有很大差异(Kusumi 2000)。近年来，*rbcL* 序列(Brunsfeld *et al.* 1994)、28S rDNA 序列(Stefanovic *et al.* 1998, 李春香，杨群 2003)、cpDNA 的 PCR-RFLP(Tsumura *et al.* 1995)的研究，都支持将金松属从杉科柏科中分离出来，成为独立一科的观点。

杉科内部的分类学研究也有着悠久的历史。我国学者李林初(1989, 1990)曾从细胞染色体核型角度对水杉及杉科内物种的系统位置进行了研究，提出一个杉科的新系统，他们支持先把金松属独立出来，然后把杉科分为柳杉亚科(柳杉属)、落羽杉亚科(水松属、落羽杉属)、红杉亚科(水杉属、巨杉属、红杉属)、杉木亚科(杉木属、密叶杉属)和台湾杉亚科(台湾杉属)5 个亚科的观点。对球果、叶片和花粉的形态构造特征研究也支持金松科独立出来，但将 9 属分成不同上述观点的三个族：北美红杉族(水杉属、巨杉属、红杉属)、落羽杉族(落羽杉属、水松属)、杉木族(台湾杉属、密叶杉属、杉木属、水松属)(于永福 1994)。形态学的分支分析和表征分析又得到了另外一种分类形式：支持金松属独立成科，其余 9 属分为柳杉族(柳杉属)、落羽杉族(水松属、落羽杉属)、北美红杉族(巨杉属、红杉属)、水杉族(水杉属)、杉木族(杉木属、密叶杉属、台湾杉属)5 族(于永福，傅立国 1996)。刘艳菊等(1996, 2003)分别关注了水杉历史地理分布和环境变迁的关系，并从古生物学角度对水杉化石进行分类地位综述。

上述研究得到的多样结果，使杉科的系统分类一直存在很大的争议。但最近从分子标记角度的研究却得到了相对一致的结果。日本学者 Kusumi 等(2000)基于叶绿体标记做了杉科系统发育研究，他们通过 4 个叶绿体片段(*matK*, *chlL*, *trnL-trnF*, *trnL*)，用最大简约法和邻接法分析得出的结果是：台湾杉属首先被划分出去，然后密叶杉属分离出去，剩下的水杉属、红杉属、巨杉属形成一支，落羽杉属和水松属形成另一支，柳杉属与他们并列自成一支。其他对叶绿体 *rbcL* 序列(Brunsfeld 1994)、叶绿体 6 个基因(*frxC*, *rbcL*, *psbA*, *pabD*, *trnK*, 16S rDNA)的 PCR-RFLP 分析(Tsumura 1995)、叶绿体 *matK* 和 *rbcL* 基因(Gadek 2000)都得出相似结果。

水杉属自建立以来，其系统分类位置一直就有争议。胡先骕和郑万钧(1948)从形态学研究认为水杉属与北美红杉属、巨杉属、落羽杉属和水松属近缘，它介于杉科和柏科之间，应另立水杉科。但其它形态学研究，以及染色体、花粉超微结构等方面的研究都不支持将水杉属另立为科(Sterling 1949, 李林初 1989, 席以珍 1988)。在水杉属与杉科其它属间关系研究中，于永福(1995)的形态学分支分析表明水杉属与红杉属、巨杉属近缘。李林初(1990)对染色体的研究也表明水杉属、红杉属、巨杉属较近的亲缘关系。Kusumi 等(2000)利用分子生物学研究手段同样得出水杉属、红杉属、巨杉属相近的亲缘关系。

基于杉科以及水杉属的系统分类争议较大，并且以前多用叶绿体 DNA 序列，线粒体

DNA 序列的分析未见报道。我们采用叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 两类染色体序列分析验证杉科 9 属 15 种 1 变种的系统分类关系。同时，探究水杉在杉科的系统发育地位，从大背景下定义水杉所处的进化位置。

2.2 材料与方法

2.2.1 样品及取样地点

2004 年 4 月至 2005 年 8 月间收集杉科 9 属所有 15 种 1 变种的样品(表 2.1)。水杉样品是 2001 年去水杉的野生产地湖北省利川县的小河乡野外调查时所采；2004 年 4 月 7 日在广州华南植物园采集了落羽杉；2004 年 4 月 29 日在浙江省临安县西天目山采了柳杉、杉木和日本柳杉三种；2004 年 5 月 1 日在四川省采了德昌杉木和米德杉木；2004 年 5 月 10 日在上海植物园分别采集了水松、池杉、墨西哥落羽杉三种；巨杉原产自美国，据报道我国杭州市有引种，但已死亡，所以于 2004 年 6 月在美国购买种子(Whatcom Seed Company)回来进行发芽，以便实验之用；红杉和台湾杉于 2004 年 9 月在杭州植物园采集；台湾杉木分布于台湾省，请台湾学者廖培钧博士于 2005 年 8 月 20 日采自台湾雪山山脉，在由武陵农场往雪山主峰攀登的路上(121°17'3"E, 24°23'2"N, 海拔 2250m)所采；密叶杉属的两种(小枝密叶杉和黄枝密叶杉)仅分布在澳大利亚的塔斯马尼亚岛(Tasmania)，因此也请澳洲学者 Greg Jordan 博士采集于 2005 年 8 月 9 日，黄枝密叶杉采于距 Fenton 湖东南 700m 的 Donson 湖边(146°38'E, 42°41'S, 海拔 950m)，小枝密叶杉采于 Donson 湖边的停车场东侧(146°35'40"E, 42°41'15"S, 海拔 950m)。

除巨杉外，其他样品均为硅胶干燥的叶片。巨杉种子先 45℃下浸种 48hr，然后移入冰箱冷藏室内 1℃低温春化 28d，期间注意保持一定的湿度，然后移入土壤中 20℃左右保持湿度，约 13d 后发芽，待长出叶片后准备提取 DNA。

选取柏科的龙柏、侧柏、刺柏作为外类群(表 2.2)。

表 2.2 外类群的采样地点与时间

Table 2.2 Sampling sites of outgroup species in this study

属	学名	中文名	缩写	采样地点	采样时间
Genus	Scientific name	Chinese name	Abbreviation	Sampling site	Data
圆柏属(<i>Sabina</i>)	<i>Sabina chinensis</i> cv. <i>Kaizuca</i>	龙柏	<i>Sa. ch</i>	华东师范大学	2005.9.22
侧柏属(<i>Platycladus</i>)	<i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco	侧柏	<i>Pl. or</i>	上海植物园	2006.3.31
刺柏属(<i>Juniperus</i>)	<i>Juniperus formosana</i> Hayata	刺柏	<i>Ju. fo</i>	上海植物园	2006.3.31

2.2.2 植物总 DNA 提取

采来植物样品中有些用 QIAGEN 的植物 DNA 提取试剂盒提取，另外一些采用 CTAB 法，在 Doyle & Doyel(1987)的方法基础上修改而成(Fan *et al.* 2004)。

2.2.2.1 材料、仪器

FastPrep™ FP120 型细胞破碎仪(Thermo Electron Corporation, Massachusetts, U.S.A);
AG 5417R 型高速冷冻离心机(Eppendorf, Hamburg, Germany);

表 2.1 本研究中杉科植物的采样地点与时间

Table 2.1 Sampling sites of species in Taxodiaceae in this study

属	学名	中文名	缩写	采样地点	采样时间	采集人
Genus	Scientific name	Chinese name	Abbreviation	Sampling site	Date	Collector
柳杉属(<i>Cryptomeria</i> D. Don)	<i>Cryptomeria fortunei</i> Hooibernk ex Otto et Dietr.	柳杉	<i>Cr. fo</i>	浙江省临安县西天目山	2004 年 4 月	张欣
	<i>Cryptomeria japonica</i> (L.f.) D.Don	日本柳杉	<i>Cr. ja</i>	浙江省临安县西天目山	2004 年 4 月	张欣
水松属(<i>Glyptostrobus</i> Endl.)	<i>Glyptostrobus pensilis</i> (Staunt.) Koch	水松	<i>Gl. pe</i>	上海植物园	2004 年 5 月	李媛媛
落羽杉属(<i>Taxodium</i> Rich)	<i>Taxodium distichum</i> (L.) Rich.	落羽杉	<i>Ta. di</i>	华南植物园	2004 年 4 月	李媛媛
	<i>Taxodium ascendens</i> Brongn.	池杉	<i>Ta. as</i>	上海植物园	2004 年 5 月	李媛媛
	<i>Taxodium mucronatum</i> Tenore.	墨西哥落羽杉	<i>Ta. mu</i>	上海植物园	2004 年 5 月	李媛媛
水杉属(<i>Metasequoia</i> Miki ex Hu et Cheng)	<i>Metasequoia glyptostroboides</i> Hu et Cheng	水杉	<i>Me. gl</i>	湖北省利川县小河乡	2001 年 8 月	陈小勇
(北美)红杉属(<i>Sequoia</i> Endl.)	<i>Sequoia sempervirens</i> (Lamb.) Endl.	红杉	<i>Se. se</i>	杭州植物园	2004 年 9 月	张欣
巨杉属(<i>Sequoiadendron</i> Buchholz)	<i>Sequoiadendron giganteum</i> (Lindl.) Buchholz	巨杉	<i>Sd. gi</i>	种子购自美国	2004 年 6 月	沈浪
杉木属(<i>Cunninghamia</i> R. Br.)	<i>Cunninghamia unicandiculata</i> DY.Wang et HL.Liu	德昌杉木	<i>Cu. un</i>	四川省德昌县杉木坪	2004 年 5 月	陈艳
	<i>Cunninghamia unicandiculata</i> var. <i>pyramidalis</i> DY.Wang et HL.Liu	米德杉木	<i>Cu. py</i>	四川省西昌市北山天人 山庄	2004 年 5 月	陈艳
	<i>Cunninghamia lanceolata</i> (Lamb.) Hook.	杉木	<i>Cu. la</i>	浙江省临安县西天目山	2004 年 4 月	张欣
	<i>Cunninghamia konishii</i> Hayata	台湾杉木	<i>Cu. ko</i>	台湾雪山山脉	2005 年 8 月	廖培钧
台湾杉属(<i>Taiwania</i> Hayata)	<i>Taiwania cryptomerioides</i> Hayata	台湾杉	<i>Tw. cr</i>	杭州植物园	2004 年 9 月	张欣
密叶杉属(<i>Athrotaxis</i> D. Don)	<i>Athrotaxis selaginoides</i> D. Don	黄枝密叶杉	<i>At. se</i>	澳大利亚塔斯马尼亚岛	2005 年 8 月	Greg Jordan
	<i>Athrotaxis cupressoides</i> D. Don	小叶密叶杉	<i>At. cu</i>	澳大利亚塔斯马尼亚岛	2005 年 8 月	Greg Jordan

Gel Doc2000™凝胶图像系统(Bio-RAD, California, U.S.A.)。

2.2.2.2 所需试剂

CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)购自 Sigma 公司, 目录号为 H6269; RNaseA 和 1 kb DNA Ladder, NaCl, EDTA, PVP, 购自上海 Sangon 公司。

(1) 洗脱缓冲液

100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.4 mol/L NaCl; 20 mmol/L EDTA, pH 8.0; 0.3% 2-巯基乙醇(V/V); 2% PVP(W/V)(聚乙烯吡咯烷酮 K-30)。2-巯基乙醇和 PVP 在使用前加入。

(2) 2×CTAB 提取缓冲液

洗脱缓冲液中加入 2% 的 CTAB(W/V)。

(3) 1×TE 缓冲液

1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA。

2.2.2.3 提取程序

(1)称取约 0.05g 硅胶干燥叶片在磨样机中粉碎 30s, 或 0.1g 新鲜叶片用液氮在研钵中研磨, 磨碎后转入 1.5ml eppendorf 管中, 加入 1ml 预冷的洗脱缓冲液。将混和液置于冰上冷却 5 分钟, 然后 13,000 rpm, 4℃离心 15min, 弃上清液。

(2)加入 750 μl 预热至 60℃的 DNA 提取缓冲液, 60℃水浴 90min。期间每隔 15 分钟上下颠倒几次 eppendorf 管, 以便充分反应。水浴结束后取出冷却至室温。

(3)加入等体积(750 μl)的氯仿-异戊醇(24:1), 上下颠倒 eppendorf 管几次, 直到形成乳浊液为止。在高速冷冻离心机上, 以 13,000 rpm, 4℃离心 15min, 取上清液。重复一次。

(4)将上清液转移到一标记好的新 eppendorf 管中, 加入 4 μl 10 mg/ml 的 RNaseA, 37℃水浴 30min。冷却至室温。

(5)再加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1), 使之形成乳浊液, 13,000 rpm, 4℃离心 15min。

(6)取上清液加入 1/3 体积 5M NaCl 溶液和 2 倍体积的冰异丙醇, 轻轻地混匀, 此时应可以看到出现白色的絮状沉淀。如果没有明显可见的沉淀产生, 将混合物放入-20℃冷冻 30min。

(7)将冷冻后的溶液 13,000 rpm, 4℃离心 15min。将液体从 eppendorf 管中倒出, 小心不要把 DNA 沉淀也一同倒了。

(8)加入 1 ml 预冷的 70%乙醇以清洗 DNA 沉淀, 10,000 rpm, 4℃条件离心 5min。重复一次。

(9)弃上清液, 将 eppendorf 管倒置于铺有吸水纸的工作台上, 自然风干, 约需 1-2hr。

(10)加入 150μl TE 缓冲液, 以溶解 DNA 沉淀。这是 DNA 储存液, 根据 DNA 产率和后续的实验要求, 实际使用时用 ddH₂O 将 DNA 储存液稀释 3 倍。

2.2.3 PCR 扩增

2.2.3.1 通用引物

本研究选取了 3 种基因组(核基因组、叶绿体基因组和线粒体基因组)常用的通用引物, 以及其它适合科下分类单元系统发育研究的引物进行实验。预实验选取了 2 个核 DNA 区域、8 个叶绿体区域和 4 个线粒体区域共 14 对引物进行扩增(表 2.3)。预实验中在有些引物

扩增无产物或大部分个体无产物、扩出条带产物低无法测序、或者测序时所有个体出现双峰等情况下，筛选出扩增效果好、易于进行测序的 4 对叶绿体和 3 对线粒体引物进行正式实验 (表 2.3 中黑体所显示)。

表 2.3 预实验使用通用引物、反应条件、扩增结果

Table 2.3 Preliminary results showing PCR conditions, sizes of amplified fragment and quality of amplification, using nrDNA, cpDNA and mtDNA universal primers in Taxodiaceae

引物名称 Primer	引物序列(5' -3') Sequence	退火温度(℃) Annealing temperature	扩增片断 长度(bp) Size	引物来源 Source
nrDNA				
ITS5- ITS4	ITS5: GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	60	1200#	White <i>et al.</i> 1990
ITS1- ITS2	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS2: GCTGCGTTCTTCATCGATGC	52-60	/	White <i>et al.</i> 1990
cpDNA				
trnT-trnL	TrnT: CATTACAAATGCGATGCTCT TrnL: TCTACCGATTTCGCCATATC	60	600*	Taberlet <i>et al.</i> 1995
trnL IGS	TrnL5': CGAAATCGGTAGACGCTACG TrnL3': GGGGATAGAGGGACTTGAAC	60	600	Taberlet <i>et al.</i> 1995
trnL-trnF IGS and trnF gene	trnL: CGAAATCGGTAGACGCTACG trnF: ATTTGAACTGGTGACACGAG	60	300-400	Taberlet <i>et al.</i> 1995
atpB-rbcL	atpB: ACATCKARTACKGGACCAATAA rbcL: AACACCAGCTTTTRAATCCAA	52	1000※	Chiang <i>et al.</i> 1998
matK	matKF: CCAAATTCGTTCTCTCTGTG matKR: TATTCCATGAGTCAGGAGAG	50-60	/	Hamilton <i>et al.</i> 1999
petG-trnP	petG: GGTCTAATTCCTATAACTTTGGC trnP: GGGATGTGGCGCAGCTTGG	49	500	Hwang <i>et al.</i> 2000
psbB- psbF	psbB: GTTTACTTTTGGGCATGCTTCG psbF: CGCAGTTCGTCTTGGACCAG	58	800*	Hamilton <i>et al.</i> 1999
trnH-Rpl2	trnH: CGGATGTAGCCAAGTGATC Rpl2: GATAATTTGATTCTTCGTCGCC	58	200*	Vaillancourt <i>et al.</i> 2000
trnV intron	trnVF: GCTATACGGGCTCGAACC trnVR: TACCTACTATTGGATTGAACC	51	800	Petit <i>et al.</i> 1998
mtDNA				
atpA	atpAF: AAGTGGATGAGATCGGTGCGAG atpAR: GGCATTCGATCACAGA	60	1200-1500	Palmer <i>et al.</i> 1992
Nad1	Nad1F: GCATTACGATCTGCAGCTCA Nad1R: GGAGCTCGATTAGTTTCTGC	56	200	Demesure <i>et al.</i> 1995

CoxIII	coxIII ^F : GGTAGATCCAAGTCCATGGC coxIII ^R : CAGTACCATGCAGCTGCTTC	60	700	Wang <i>et al.</i> 1996
---------------	--	----	-----	-------------------------

注：/表示扩增无产物；*表示产物只在少部分个体中扩出；#表示测序时为双峰；※表示扩增产物浓度低；
黑色字体表示本研究中采用的引物。

2.2.3.2 PCR 扩增程序

(1) 实验仪器与药品

PTC220 型 DNA Engine PCR 热循环仪(MJ research, USA);
Eppendorf 微量移液器(Eppendorf, Hamburg, Germany);
AG 5417R 型高速冷冻离心机(Eppendorf, Hamburg, Germany);
Gel Doc2000™凝胶图像系统(Bio-RAD, California, U.S.A.)。

所有引物均由上海生工生物工程公司在美国 PE 公司 391 型 DNA 自动合成仪上合成，
加 dH₂O 至使用浓度 4μM；

Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等均购自上海生工，其中 10×PCR 反应缓冲液和 25mM MgCl₂
由 Taq DNA 聚合酶厂家赠送。

(2) 10×PCR 反应缓冲液

100 mM KCl; 80 mM (NH₄)₂SO₄; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; NP-40。

(3) 1×PCR 反应体系(总反应体积为 50μl)

Primer1 0.2 μM
Primer2 0.2 μM
1×PCR 反应缓冲液
模板 DNA 50 ng
2.5 mM MgCl₂
200 μM dNTPs
2 单位 Taq DNA 聚合酶
加 dH₂O 至总体积 50μl

(4) PCR 反应程序

94℃	5 min	DNA 模板预变性	1 cycle
94℃	40 sec	DNA 模板变性	
Tm	50 sec	退火，引物与模板结合；	
72℃	1min30sec	延伸	
35 cycles			
72℃	10 min	延伸	1 cycle

(5) 采用 1.5%的琼脂糖凝胶检测扩增结果

2.2.4 测序

共有 7 对引物 19 个个体的扩增产物进行测序，19 个体中 16 个为杉科共 9 属的个体，
另外选取 3 个柏科植物——龙柏、侧柏和刺柏，作为系统发育树重建过程中的外类群(表 2.2)。

扩增产物送到上海基康生物有限公司纯化，然后进行测序，使用 3700 DNA Analysis System(PE Applied Biosystems, USA)对扩增结果进行测序分析。

trnL IGS、trnL-trnF IGS and trnF gene、petG-trnP、Nad1、CoxIII分别使用 PCR 扩增时的引物测序，atpA 由于片段较长，双向也无法测通，因此除使用 1 对 PCR 扩增引物外，还设计中间测序引物测通拼接而成。trnV 序列双向测序中反向一端都为双峰，因此也设计中间测序引物拼接而成(表 2.4)。

表 2.4 引物测序时的中间测序引物序列

Table 2.4 The sequences of walking primers

中间测序引物名称	序列
Walking primer	Sequence
atpA	
	FW AACTGATCATTGGGGACC
	RW TTTCAATTACGGGTAACG
	GAATAGAAAACATCCCCTG
	AATAGAAAACATCCCCTGG
	GAGTGCGAATAGAAAACATC
trnV	
	FW TTGTCATGCTATTGTTCTCC
	ATGCACCCGAGATTGAC
	TGTCCCCGAGATTGACC
	GACATTGAATGAAACCGAG
	TTGTCATGCTATTGTTCTCC
	TTGTCATGCTATTGTTCTCC

2.2.5 DNA 序列分析

序列的编辑用 SeqMan II 完成，边界以烟草(*Nicotiana tabacum*)的叶绿体和线粒体基因组作为参照确定。

采用 ClustalX ver.1.18(Thomopson *et al.* 1997)进行序列对位排列，进一步对序列中计算机误读的个别碱基进行人工校对排列。之后，保存为*.nex 格式文件。

系统发育分析采用 PAUP v.4.0(Swofford 1998)软件中的最大简约法和邻接法(Saitou & Nei 1987)对 7 对引物序列进行独立的和联合的系统发育分析。

最大简约法分析中，所有的空位作为缺失处理，所有的核苷酸等权处理。采用分支-边界法(branch and bound)的搜索策略，搜索参数设为：TBR 枝长交换，MULPARS，ACCTRAN 优化，500 次随机序列加入。当最大简约树不只一棵时，则计算出他们的严格一致树(strict consensus tree)或 50%多数一致树(50% majority-rule consensus tree)。系统树各分支的相对支持率采用 bootstrap 分析进行检验，1000 次重复取样，启发性(heuristic)搜索。以柏科龙柏、

侧柏、刺柏作为外类群。
分析后得到的系统树用 Treeview ver.1.6.6(Roderic 2001)形成。

2.3 结果

2.3.1 杉科物种的各引物 DNA 序列特征

所测 16 个个体的 cpDNA trnL IGS, trnL-trnF IGS and trnF gene, petG-trnP, trnV 序列和 mtDNA atpA, Nad1, CoxIII 序列的测序结果见表 2.5。

表 2.5 进行测序的 7 对引物 19 个个体及测序结果
Table 2.5 19 species and their sequencing sizes in this study

物种 Species	缩写 Abbreviation	序列长度(bp) Size						
		trnL	trnL-trnF IGS	petG-trnP	trnV	atpA	Nad1	CoxIII
		IGS	and trnF gene	IGS and gene	gene	gene	gene	gene
柳杉	<i>Cr. fo</i>	317	234 ∞	417 ∞	749	1139 $\rightarrow$	119	532
日本柳杉	<i>Cr. ja</i>	317	229 ∞	417	749	1139 $\rightarrow$	119	532
水松	<i>Gl. pe</i>	324	207	420	755	1140 $\rightarrow$	119	532
落羽杉	<i>Ta. di</i>	324	207	420	755	1140 $\leftarrow$	119	532
池杉	<i>Ta. as</i>	324	207	420	755	1141	119	532
墨西哥落羽杉	<i>Ta. mu</i>	324	207	420	755	1140	119	532
水杉	<i>Me. gl</i>	338 ∞	208	437 ∞	735	1136	119	532
红杉	<i>Se. se</i>	328	$\times$	517 ∞	$\approx$	1137 $\leftarrow$	119	532
巨杉	<i>Sd. gi</i>	328	$\times$	516 ∞	$\approx$	1137 $\rightarrow$	119	532
德昌杉木	<i>Cu. un</i>	333	198	420	750	1136	119	532
米德杉木	<i>Cu. py</i>	333	198	420	750	1137 $\rightarrow$	119	532
杉木	<i>Cu. la</i>	333	198	420	750	1137 $\leftarrow$	119	532
台湾杉木	<i>Cu. ko</i>	334	181	420	$\approx$	1140 $\leftarrow$	119	$\times$
台湾杉	<i>Tw. cr</i>	317	199	456	$\approx$	1137 $\leftarrow$	119	532
黄枝密叶杉	<i>At. se</i>	309	$\times$	381	$\times$	1170 $\leftarrow$	119	532
小叶密叶杉	<i>At. cu</i>	308	$\approx$	382	$\times$	1170 $\leftarrow$	119	532
龙柏	<i>Sa. ch</i>	131	198	396	729	1134 $\leftarrow$	119	532
侧柏	<i>Pl. or</i>	322	$\times$	432	$\approx$	1134 $\rightarrow$	119	532
刺柏	<i>Ju. fo</i>	131	191	397	$\approx$	1134 $\rightarrow$	119	532

注： ∞ 表示中间有重复(polyT or polyA)结构，双向测序拼接结果； $\times$ 表示扩增无产物； $\approx$ 表示测序有杂峰； $\rightarrow$ 表示设计中间引物 FW1； $\leftarrow$ 表示设计中间引物 RW1。

2.3.1.1 trnL IGS 序列

trnL IGS 序列是叶绿体中合成亮氨酸转运 RNA(tRNA-Leu)的基因，位于环状叶绿体的

大单拷贝区(large single copy region, LSC)内，烟草中 IGS 区为 49337bp-49839bp(烟草叶绿体长 155943bp)。该引物的测序情况请见表 2.5。我们测得杉科植物的序列长 308-334bp，外类群龙柏和刺柏序列长度都只有 131bp，侧柏长度 322bp。序列全部位于 trnL 的非编码区内(图 2.2)。序列中只有水杉在 200bp 左右有一段 polyT 结构，测序时影响后续反应，序列进行反向测序拼接。

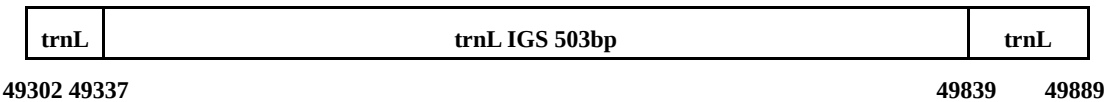


图 2.2 烟草 cpDNA 的 trnL IGS 位置

Figure 2.2 The location of trnL IGS in cpDNA of *Nicotiana tabacum*

trnL IGS 序列对位排列后总长度 361bp，其中 48 个变异位点，占 13.33%。两个密叶杉属物种在 170-200bp 区域与其它物种差别较大，缺失 27 个碱基；台湾杉在 183-207bp 间缺失；柳杉和日本柳杉在 241-250bp 间缺失。值得注意的是水杉，在 240bp 附近有一个较长的 polyT 结构，致使测序都需要双向测通，其它物种均无此结构。该序列变异举例如下：

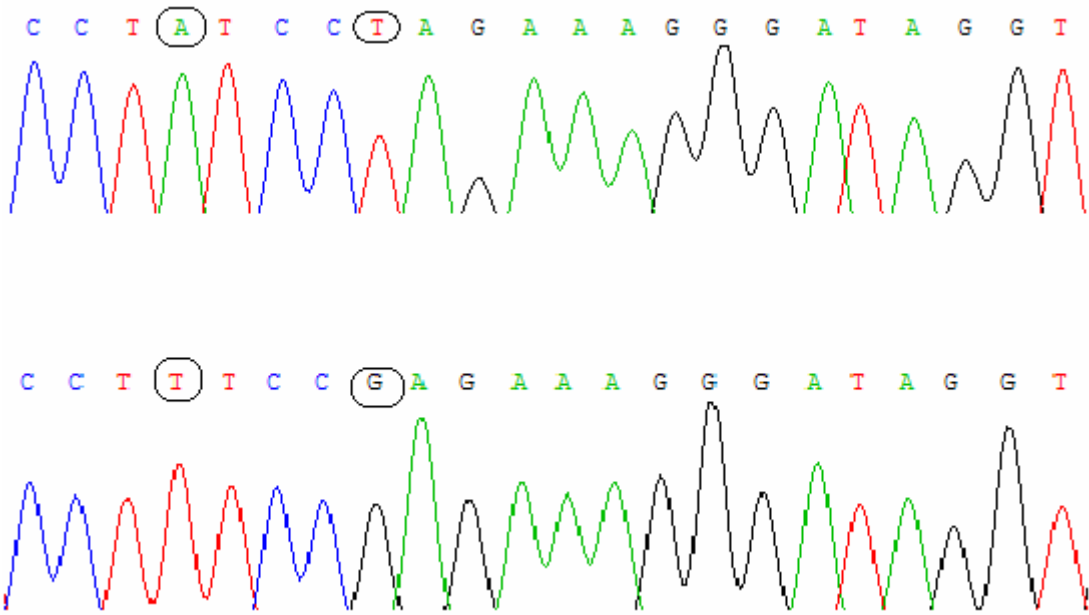


图 2.3 trnL IGS 片段变异

Figure 2.3 Mutation position of trnL IGS

注：上图为德昌杉木序列；下图为黄枝密叶杉序列，圆圈示变异位点。

2.3.1.2 trnL-trnF IGS and trnF gene 序列

trnL-trnF IGS and trnF gene 序列位于环状叶绿体的 LSC 内，是叶绿体中编码 trnL(亮氨

酸转运 RNA)的基因和编码 trnF(苯丙氨酸转运 RNA)基因的间隔区域和编码 trnF 基因的一段。在烟草中这段间隔区是位于第 49890bp 至 50245bp 间的碱基序列(图 2.4)。

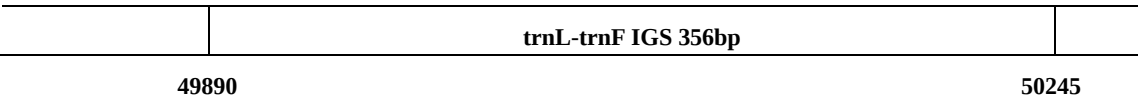


图 2.4 烟草 cpDNA 的 trnL-trnF 位置

Figure 2.4 The location of trnL-trnF IGS in cpDNA of *Nicotiana tabacum*

表 2.6 trnL-trnF IGS and trnF gene 序列 Genbank 中序列号

Table 2.6 The accession number in Genbank of trnL-trnF IGS and trnF gene sequence

物种	学名	Genbank 序列号
Species	Scientific name	Accession number in Genbank
红杉	<i>Sequoia sempervirens</i>	AB029855*
巨杉	<i>Sequoiadendron giganteum</i>	AB029856*
黄枝密叶杉	<i>Athrotaxis selaginoides</i>	AB029863*
小叶密叶杉	<i>Athrotaxis cupressoides</i>	AB029862*

注：*来源为 Kusumi *et al.* 2000。

引物 trnL-trnF 的测序情况见表 2.5。我们测得杉科植物的序列长 181-229bp，外类群龙柏为 198bp，刺柏 191bp。序列大部分位于 trnL-trnF IGS 非编码区内，另一小部分位于 trnF 基因编码区。该引物中柳杉和日本柳杉测序中在大约 20-50bp 区域出现 polyAT 结构，影响后续反应，所以反向测序拼接而成。红杉、巨杉、小叶密叶杉扩增无结果，黄枝密叶杉扩增结果测序有杂峰，结果不可辨，因此我们采用来自 GenBank 的数据分析，表 2.6 中显示了它们的序列号。侧柏扩增也无结果，因此外类群只用龙柏和刺柏。

trnL-trnF IGS and trnF gene 序列对位排列后共 234bp，其中变异位点 22 个，占 9.40%。所有序列中，作为外类群的龙柏和刺柏差异最大，尤其是前 80bp 中匹配率只有 21.25%(17/80)，80bp 后至 229bp 区域内匹配率约 90%，在 ClustalX 程序初排序时，龙柏、刺柏序列位于最后。柳杉和日本柳杉两种植物由于 polyAT 结构，差异也比其它物种之间大些。典型变异请见图 2.5。

2.3.1.3 petG-trnP 序列

引物 petG-trnP 的结合位点为长度为 114bp 编码 petG(细胞色素 b/f 复合物)的基因和长度为 74bp 编码 trnP(脯氨酸转运 RNA)的基因上，两段基因间含有两段非编码区和一个长 74bp 编码 trnW(色氨酸转运 RNA)的基因区。在模式种烟草的 cpDNA 中，petG 基因位于 68570bp 至 68683bp 之间，中间一段 131bp 的非编码区后在 68815bp 至 68888bp 间为编码 trnW 的基因区，164bp 长的非编码区后在 69053bp 到 69126bp 为编码 trnP 的基因(见图 2.6)。

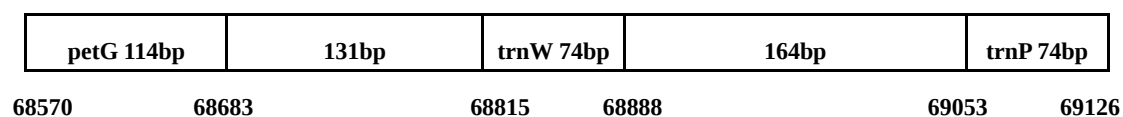


图 2.6 烟草 cpDNA 的 *petG-trnP* 位置

Figure 2.6 The location of *petG-trnP* in cpDNA of tobacco

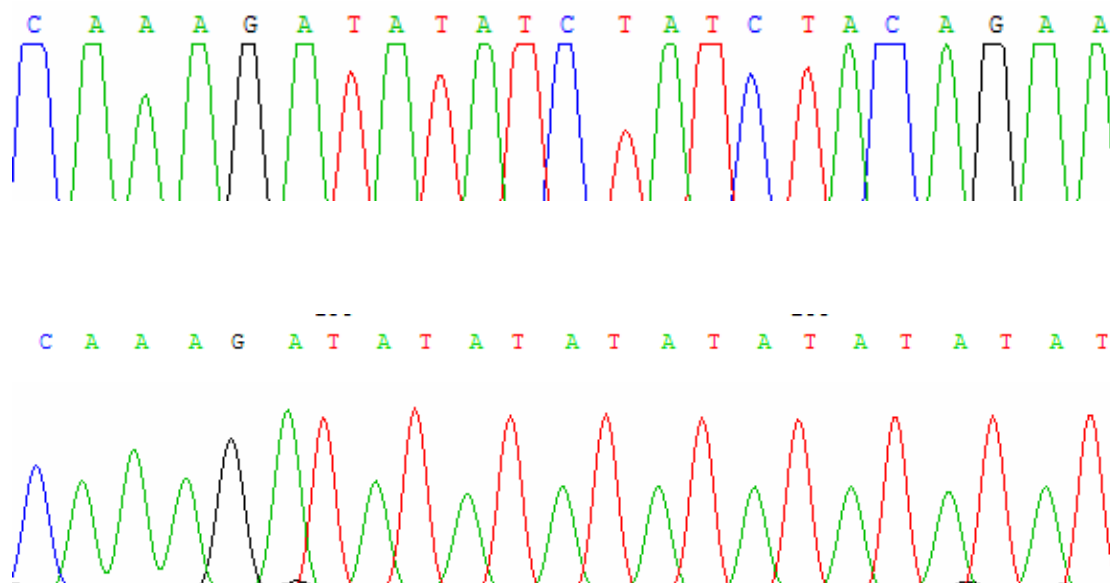


图 2.5 trnL-trnF IGS and trnF gene 片段典型变异

Figure 2.5 Mutation position of trnL-trnF IGS and trnF gene

注：上图为常见序列、以物种墨西哥落羽杉为例；下图为变异物种柳杉，示 polyAT 结构。

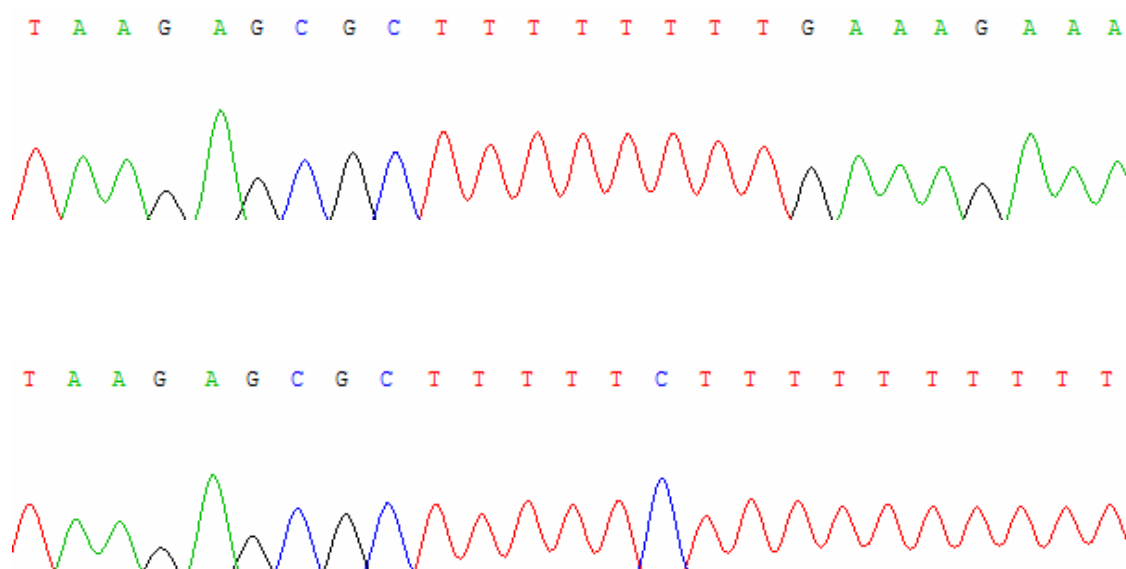


图 2.7 *petG-trnP* 片段变异(示 polyT 结构)

Figure 2.7 Mutation position of *petG-trnP*

注：上图为杉木序列；下图为红杉序列。

引物 petG-trnP 的测序情况见表 2.5。测得杉科植物的序列长 381-517bp 不等，外类群龙柏为 396bp，侧柏为 432bp，刺柏为 397bp。该序列中柳杉、水杉、红杉和巨杉在 320bp 附近出现 ployT 结构，后续序列由反向测序拼接而成。

petG-trnP 序列对位排列后共 580bp，不过序列中插入缺失片段极多，影响序列的信息量。其中变异位点 18 个，占 3.10%。红杉和巨杉在 140-230bp 有一段独特的长序列，其它物种没有。密叶杉属两种在 370-405bp 间缺失。台湾杉在 435-463bp 段有独特序列，其它物种缺失。所有序列中，由 ClaustalX 初步比对排序，3 个外类群都位于最后位置。图 2.7 所示两种不同数目的 ployT 结构。

2.3.1.4 trnV 序列

trnV 序列(缬氨酸转运 RNA)包括两个 trnV 的编码区和中间的非编码区，烟草叶绿体中，该编码区位于 53760-53794bp 及 54366-54403bp 间，非编码区是 53795-54365bp 间 571bp 的区域。我们测得杉科该区域为长度从 trnV IGS 一端到另一端 trnV 基因，再覆盖 trnV-trnM IGS 以及 trnM(蛋氨酸转运 RNA)基因，至 trnM 基因后的第四个碱基(图 2.8)。

	trnV	trnV IGS	trnV	trnV-trnM IGS	trnM	
53760	53794		54366	54403	54594	54666

图 2.8 烟草 cpDNA 的 trnV 位置
Figure 2.8 The location of trnV in cpDNA of tobacco

引物 trnV 的测序情况见表 2.5。杉科各物种序列长 381-517bp 不等，龙柏长 396bp。密叶杉属两种扩增无产物，红杉、台湾杉、台湾杉木、巨杉和外类群侧柏、刺柏扩增结果测序都有杂峰，无法辨别碱基，这几个物种该片段 Genbank 数据库中也没有收录。

该引物其它个体序列的整体匹配率较高，约达到 90%。只在 630-680bp 一段序列中差别较大，明显的分成两个阵营：德昌杉木、米德杉木、杉木和台湾杉序列相似，水松、落羽杉、池杉、墨西哥落羽杉、日本柳杉和柳杉序列相似，另外，水杉和外类群龙柏在这一段缺失较多，不与任一阵营相似。trnV 序列的变异如图 2.9。

2.3.1.5 atpA 序列

atpA 序列是线粒体内编码 ATP 合成酶第一亚基的基因，烟草中的位置从 261287bp 至 262816bp 之间(烟草的线粒体长 430597bp)(图 2.10)。

	atpA gene	
261287		262816

图 2.10 烟草 mtDNA 的 atpA 位置
Figure 2.10 The location of atpA in mtDNA of tobacco

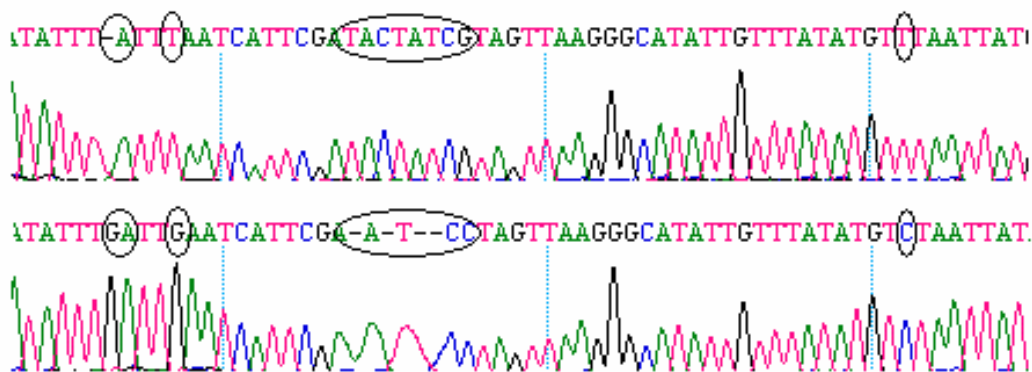


图 2.9 trnV 片段变异

Figure 2.9 Mutation position of trnV

注：上图为德昌杉木序列；下图为落羽杉序列。

本研究中，测出序列全部在 *atpA* 基因编码区内。序列长 1136-1170bp 之间，外类群龙柏、侧柏、刺柏长度都为 1134bp。由于一个反应一般只能测序长度约 500bp，因此该引物除两端测序之外大部分还需要在中间根据 DNA 序列设计一条测序引物，才能把整条序列测完整。引物设计根据不同个体序列设计了两种：从 5'端延伸过去的 FW1 引物和从 3'端往回延伸的 RW2 引物，具体个体采用引物情况在表 2.4 中标明。

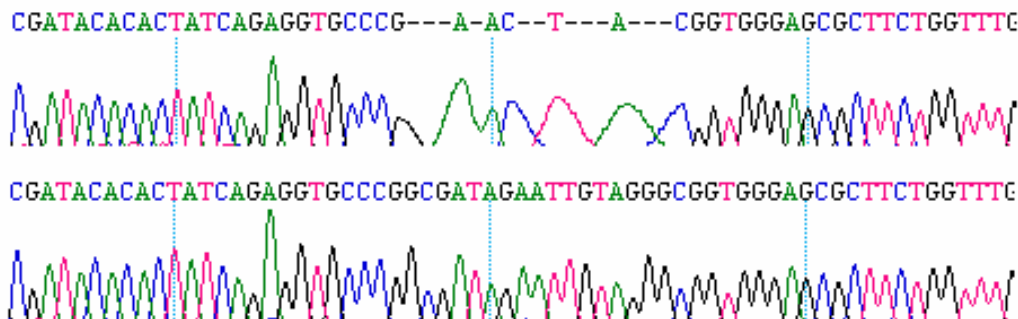


图 2.11 *atpA* 片段变异(示插入缺失片段)

Figure 2.11 Mutation position of *atpA*

注：上图为红杉序列；下图为小叶密叶杉序列。

测序结果中该引物的匹配率较高。序列重排后共有 1177bp，变异位点 46 个，占 3.91%，其中一些变异是：第 6 个碱基，外类群刺柏由 G 变为 A；第 27 碱基杉木、德昌杉木、米德杉木和台湾杉木由 C 变为 T；第 53 碱基柳杉和日本柳杉由 C 变为 T；57 碱基落羽杉、墨西哥落羽杉、池杉和水松由 G 变为 A；第 100 碱基，杉木、德昌杉木、米德杉木、台湾杉木以及台湾杉由 A 变为 G；115 碱基柳杉和日本柳杉由 C 变为 T 等等。

插入缺失比较大的区域是在 230-260bp 段，密叶杉属两种在这段有很大的插入序列，约 20 个碱基。同样这两个物种在 460-480bp 段也有十几个碱基的插入。但尽管如此，使用 ClastalX 程序对所有序列初排序时，龙柏序列还是排在最后一个。该引物的变异例图如图 2.11。

2.3.1.6 Nad1 序列

nad1 序列是线粒体内编码 NADH 脱氢化酶复合体 8 个亚基的第一亚基的基因，它又由 5 个单元组成，我们所研究的是第三单元，它在烟草线粒体的位置是 142903-143094bp。我们测的序列全部在该基因的编码区内(图 2.12)。

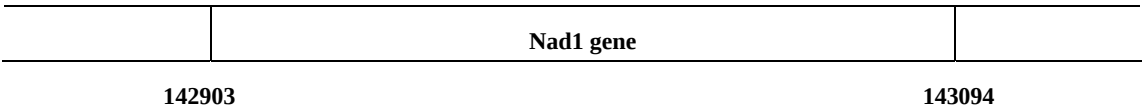


图 2.12 烟草 mtDNA 的 nad1 位置
Figure 2.12 The location of nad1 in mtDNA of toba

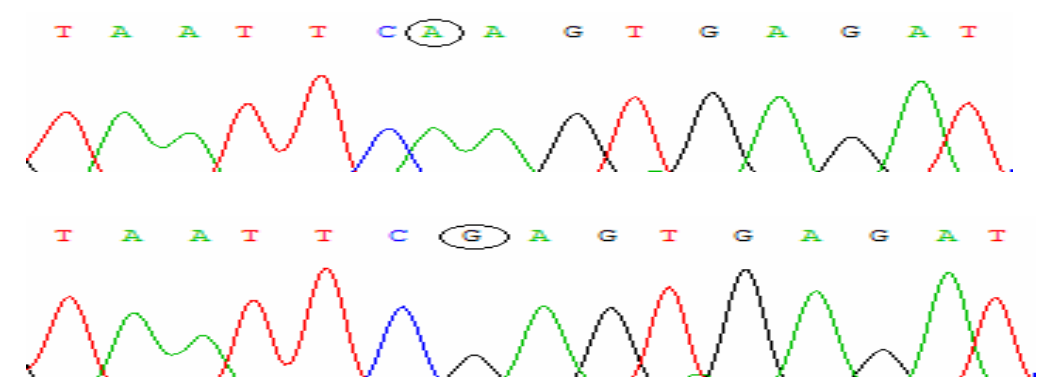


图 2.13 nad1 片段变异(示颠换)
Figure 2.13 Mutation position of nad1
注：上图为水杉序列；下图为日本柳杉序列。

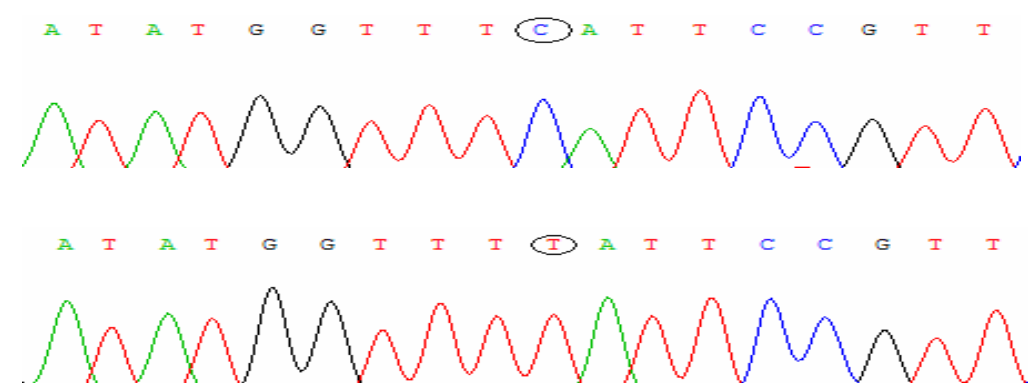


图 2.15 coxIII片段变异(示颠换)
Figure 2.15 Mutation position of coxIII
注：上图为德昌杉木序列；下图为水杉序列。

我们所测得这条引物的序列中，所有序列的长度都是 119bp，包括外类群。119bp 中只有一个变异，在 29bp 位点柳杉和日本柳杉序列发生一个颠换：由 G 突变成了 A。其它物种均无差别，包括外类群也无差别。图 2.13 显示了该引物的突变点。

2.3.1.7 CoxIII序列

CoxIII序列是编码细胞色素 C 氧化酶三个大亚基的第三亚基基因。它在烟草中的位置是 258844bp 至 259641bp 之间(请见下图)，我们测的序列全部在该基因的编码区内。

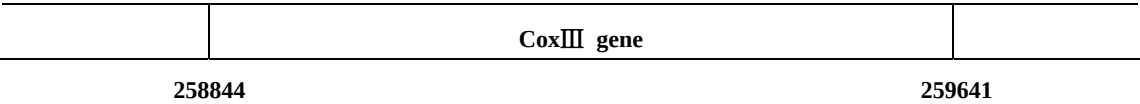


图 2.14 烟草 mtDNA 的 coxIII位置
Figure 2.14 The location of CoxIII in mtDNA of tobacco

实验中，台湾杉木扩增不出产物，Genbank 数据库中也无此序列的收录，因此无法得到结果。其它物种测得序列长度全部为 532bp。该引物 4 处碱基发生置换现象：167bp 杉木、德昌杉木和米德杉木把 T 置换成 C；239bp 台湾杉由 G 变成 A；403bp 巨杉和 3 个外类群龙柏、侧柏、刺柏由 C 变为 T；438bp 杉木、德昌杉木、米德杉木、水松和小枝密叶杉是 C，其它都为 T。此序列变异举例如图 2.15。

2.3.2. 系统发育分析

用 ClustalX 软件分别对每个序列建树分析，分别得到以下结果。

2.3.2.1 trnL IGS 序列

在 PAUP 4.0 软件上用 MP 法共得到 2325 棵最大简约树，建树结果如下：

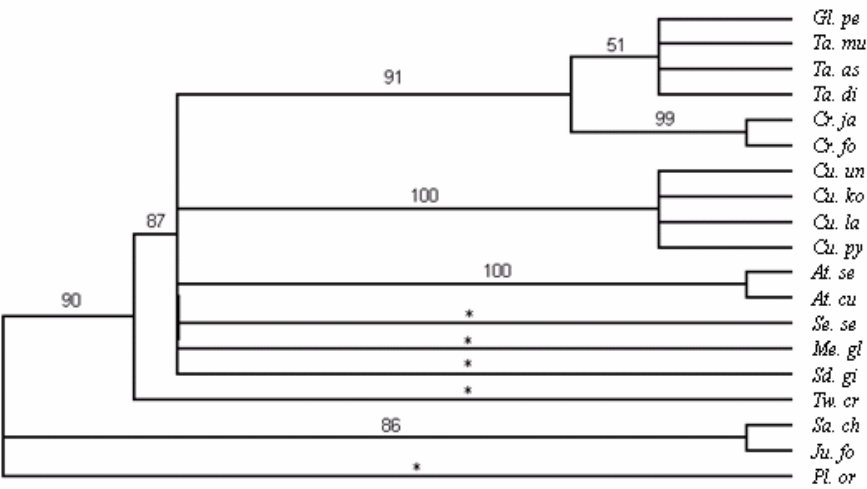


图 2.16 trnL IGS 序列的 50%多数一致树
Figure 2.16 The 50% Majority-rule consensus tree of Taxodiaceae species and outgroup based on trnL IGS sequences

注：分支上的数字表示支持率> 50%的 bootstrap 值，* 表示该分支的支持率<50%。

柳杉属 2 种(柳杉、日本柳杉)首先聚为一支, 支持率为 99%, 水松和落羽杉属 3 种(落羽杉、墨西哥落羽杉、池杉)聚成一支, 支持率为 51%, 这两支再聚在一起, 获得支持率 91%。杉木属 4 个(德昌杉木、米德杉木、杉木、台湾杉木)聚为一类, 支持率 100%。密叶杉属两种聚为一类, 支持率同样是 100%。但巨杉、红杉、水杉都没有获得超过 50%的支持率, 零散的与上述 3 大类群聚在一起, 以 87%的支持率与台湾杉聚合。杉科获得的总支持率是 90%。外类群龙柏和刺柏先聚合, 再与侧柏和杉科一起聚合。

该序列中, 水杉没有获得超过 50%的支持率, 并且未与其它杉科物种聚在一起, 不过在柏科物种作为外类群下, 水杉还是在杉科类群中。

2.3.2.2 trnL-trnF IGS and trnF gene 序列

在 PAUP 4.0 软件上用 MP 法共得到 113 棵最大简约树, 建树结果如下:

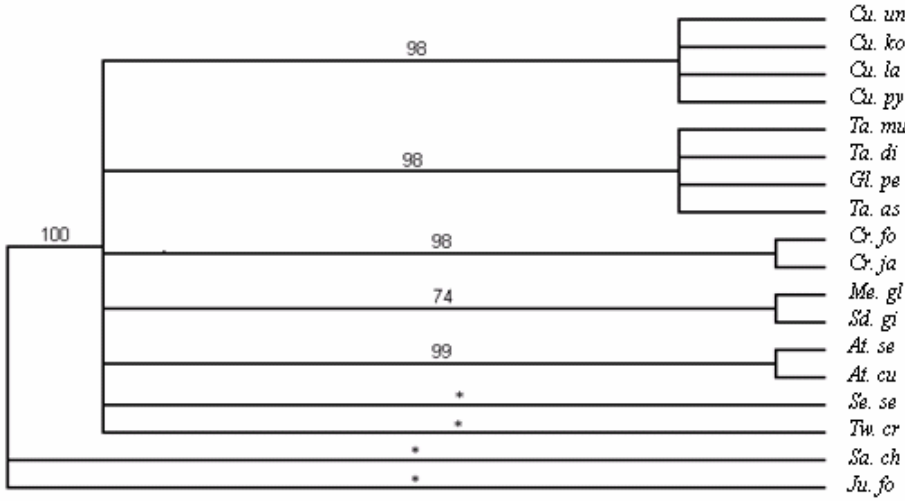


图 2.17 trnL-trnF IGS and trnF gene 序列的 50%多数一致树

Figure 2.17 The 50% Majority-rule consensus tree of Taxodiaceae species and outgroup based on trnL-trnF IGS and trnF gene sequences

注: 分支上的数字表示支持率> 50%的 bootstrap 值, * 表示该分支的支持率<50%。

杉木属 4 个个体(德昌杉木、米德杉木、杉木、台湾杉木)聚为一类, 支持率 98%; 水松还是和落羽杉属 3 个种(落羽杉、墨西哥落羽杉、池杉)聚为一类, 支持率也是 98%; 柳杉属 2 种(柳杉和日本柳杉)仍以 98%的支持率聚为一类; 密叶杉属 2 种以 99%的支持率聚类; 水杉和巨杉以 74%的支持率也聚为一类; 以上 5 类再与红杉、台湾杉聚为杉科, 但红杉和台湾杉的支持率都不高。杉科所有物种以 100%的支持率与外类群龙柏和刺柏聚合, 不过外类群支持率不到 50%。

此序列中, 水杉和巨杉聚类, 再与杉科其它种聚合。

水松和落羽杉属 3 个种(落羽杉、墨西哥落羽杉、池杉)以 97%的支持率聚为一类,再与柳杉属 2 种(柳杉和日本柳杉)形成的一类聚合,支持率为 66%。另一支由杉木属 4 个个体(德昌杉木、米德杉木、杉木、台湾杉木)首先聚为一类,支持率 99%,再与台湾杉聚合,形成一支。水杉、红杉和巨杉以 63%的支持率聚在一起形成第 3 支。以上 3 支聚合,最后与密叶杉属 2 种聚合。杉科所有物种以 99%的支持率与外类群龙柏、刺柏、侧柏聚合,外类群

的支持率都不到 50%。

此序列中，水杉与红杉、巨杉聚为一类，显示了与北美两种类较近的亲缘关系。

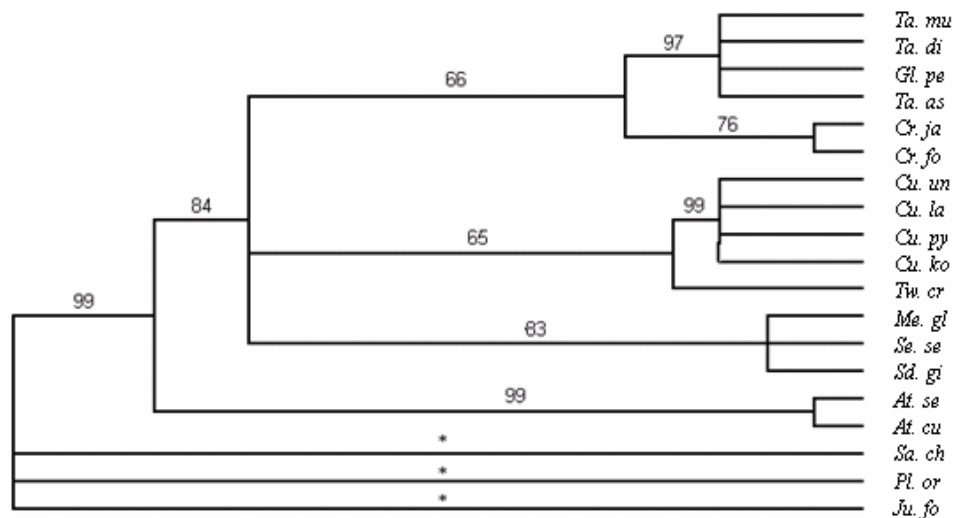


图 2.19 atpA 序列的 50%多数一致树

Figure 2.19 The 50% Majority-rule consensus tree of Taxodiaceae species and outgroup based on atpA sequences

注：分支上的数字表示支持率> 50%的 bootstrap 值，* 表示该分支的支持率<50%

2.3.2.6 Nad1 序列

此引物序列比较短，只有 119bp，并且只有 1 个变异，数据不足以建系统发育树分析，因此不单独建树。

2.3.2.7 CoxIII序列

CoxIII长度虽然 532bp，但变异位点仅有 4 个，变异信息少不足以分析 18 个物种的系统发育过程，因此该引物不单独建树。

2.3.2.8 序列联合建树

运用联合分析可以提高重建系统发育树的准确性(Cunningham 1997, 施苏华等 2003)，因此我们联合所测序列建一个系统发育树。把叶绿体和线粒体序列分别联合建树。

叶绿体中，由于 trnV 有 5 个物种无序列信息，所以在建树时只采用 trnL IGS、trnL-trnF IGS and trnF gene、petG-trnP 三个叶绿体序列共 1168bp 联合建树(见下图)，外类群仍采用龙柏、刺柏和侧柏(缺少 trnL-trnF IGS and trnF gene 序列的信息)。1168 个位点中变异位点有 88 个，占 7.53%。用 ClustalX 对位排列序列时，外类群位于最后。

叶绿体序列联合建树时，共得到 421 棵最大简约树，建树图如下：

杉木属 4 个个体(德昌杉木、米德杉木、杉木、台湾杉木)首先聚为一类，支持率 100%，再与台湾杉聚合，形成一支。红杉和巨杉以 99%的支持率聚在一起，再与水杉聚合。密叶杉属 2 个体(黄枝密叶杉和小叶密叶杉)聚合为一类，获得支持率 100%。这 3 类获得 86%的支持率聚合在一起。

水松和落羽杉属 3 个个体(落羽杉、墨西哥落羽杉、池杉)以 100%的支持率聚为一类，再与柳杉属 2 种(柳杉和日本柳杉)形成的一类聚合，支持率为 98%。

以上两大类以 99%的支持率与外类群聚合。

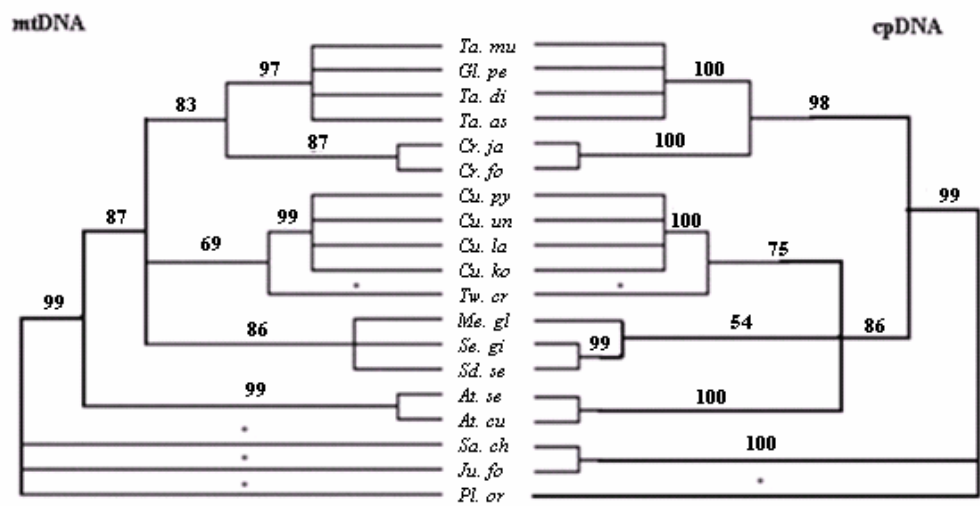


图 2.20 叶绿体序列联合和线粒体序列联合分别建立的 50%多数一致树

Figure 2.20 The 50% Majority-rule consensus tree of Taxodiaceae species and outgroup based on the sequences of combined trnL IGS、trnL-trnF IGS and trnF gene、petG-trnP and the sequences of combined atpA、Nad1、CoxIII

注：左边为线粒体 atpA、Nad1、CoxIII 合并序列的 50%多数一致树，右边为叶绿体 trnL IGS、trnL-trnF IGS and trnF gene、petG-trnP 合并序列的 50%多数一致树；虚线所示为没有获得 CoxIII 数据的物种。

线粒体建树采用 atpA、Nad1 和 CoxIII 三个序列共 1825bp 联合建树(见上图)，外类群仍采用龙柏、刺柏和侧柏。1825 个位点中变异位点有 51 个，占 2.79%。

线粒体序列联合建树时，共得到 77 棵最大简约树。

水松和落羽杉属 3 个个体(落羽杉、墨西哥落羽杉、池杉)以 97%的支持率聚为一类，再与柳杉属 2 种(柳杉和日本柳杉)形成的一类聚合，支持率为 83%，形成一支。杉木属 4 个个体(德昌杉木、米德杉木、杉木、台湾杉木)聚为一类，支持率 99%，再与台湾杉聚合，形成一支。水杉、红杉和巨杉以 86%的支持率聚为一支。以上 3 大类聚合一起。

密叶杉属 2 个体(黄枝密叶杉和小叶密叶杉)聚合为一类，获得支持率 99%。再与以上 3 类聚合的一大支聚在一起。最后以 99%的支持率与外类群聚合。

叶绿体和线粒体联合建树时，水杉都与超过 50%的支持率与红杉和巨杉聚为一类，显示了水杉与二者较近的亲缘关系。

2.4 讨论

杉科的系统发育研究一直是人们关注的热点之一(李林初 1989,1990, 于永福 1994,1996, Kusumi 2000)，加之杉科和柏科错综复杂的关系更加成为众多科学工作者研究的焦点(Eckenwalder 1976; Hart 1987; Price & Lowenstein 1989; Brunsfeld 1994; Tsumura 1995; Gadek

2000; 李春香, 杨群 2003)。本研究基于叶绿体、线粒体两种基因组独立地和联合地对杉科系统发育关系再次进行探究。

叶绿体与线粒体 DNA 联合重建的杉科系统发育树中, 一致地把杉科分为 5 族: 水松属和落羽杉属为落羽杉族; 柳杉属为柳杉族; 台湾杉属和杉木属为杉木族; 水杉属、巨杉属和红杉属为红杉族; 密叶杉属 2 种为密叶杉族。与形态学和细胞学的分类略有差异: 李林初(1989, 1990)从细胞染色体核型角度认为杉木族为杉木属和密叶杉属组成, 而台湾杉属自成一族。于永福和傅立国(1996)的形态学的分支分析和表征分析把水杉属单独成立一族, 而台湾杉属、杉木属和密叶杉属合并成一族。但是, 与 Kusumi 等(2000)叶绿体 DNA 序列的最大简约树基本一致。他们以杉木属作为外类群时, 台湾杉属首先分离出去, 显示了两属相近的关系, 与我们的结果相一致。

叶绿体和线粒体 DNA 都分为 5 族是一致的, 但 5 族之间的亲缘关系稍有不同。线粒体 DNA 是杉木族、落羽杉族和柳杉族、红杉族 4 族的关系较近, 然后再是密叶杉族。而叶绿体 DNA 是杉木族、红杉族、密叶杉族 3 族关系较近, 然后是落羽杉族和柳杉族的组合。Kusumi 等(2000)叶绿体序列结果是杉木族做外类群时, 落羽杉族和柳杉族组合与之关系最远, 它们先与柏科物种聚为一起, 然后再和杉科聚合。而与杉木相近的依次是密叶杉族和红杉族。我们的叶绿体 DNA 系统发育格局与 Kusumi 等(2000)的更接近一些, 说明了杉科研究中不同序列的叶绿体基因组形成的格局还是比叶绿体与线粒体两基因组形成格局更相似。

研究中, 4 个叶绿体 DNA 片段与 3 个线粒体 DNA 的碱基序列变异程度明显不同, 叶绿体 DNA 联合序列 1168 个位点中变异位点有 88 个, 占 7.53%, 线粒体 DNA 联合序列 1825 个位点中变异位点有 51 个, 占 2.79%, 叶绿体 DNA 的变异显著比线粒体 DNA 大。杉科 4 个叶绿体 DNA 片段除有大量的碱基置换外, 还都有部分个体连续几个或十几个甚至几十个的碱基插入缺失现象或者出现特殊结构现象。如: trnL IGS 序列中密叶杉两种、台湾杉、柳杉和日本柳杉在不同位置的十几至二十几碱基的缺失; trnL-trnF IGS and trnF gene 序列中柳杉和日本柳杉的 polyAT 结构; petG-trnP 序列柳杉、水杉和红杉的 polyT 结构以及 trnV 序列中水杉在 630-680bp 碱基的大量缺失。而线粒体片段中, 几乎只有单个碱基置换现象, 如 nad1 序列 119bp 碱基内只有一个置换现象; coxIII 片段中 532bp 长度只发生了 4 处碱基置换; atpA 序列 1100 多碱基长度中, 也只有密叶杉属的两处十几个碱基的插入, 其它零星有些碱基置换现象。除了与线粒体片段都位于编码区而叶绿体片段有些还位于非编码区有关外, 还证明了线粒体 DNA 核苷酸替换率远远低于叶绿体 DNA 的替换率(Petit *et al.* 1998)。

在序列比对中还有一个比较突出的发现是水杉序列的问题, 水杉的叶绿体 DNA 显示了比较特殊的特征。4 个叶绿体 DNA 片段中, petG-trnP 序列柳杉、红杉和水杉都出现了 polyT 的结构, 而其它物种都没有。另外一个片段 trnL IGS 序列, 在其它杉科物种都没有特殊结构的情况下, 水杉又出现了 polyT 结构。这都不得不说明水杉属进化上比较孤立的系统位置(于永福 1995), 这种大量出现重复 T 碱基的现象在进化上是否有意义以及有何意义还需进一步探究。但是, 尽管水杉的序列比较特殊, 但 DNA 的分析还是验证了水杉与红杉、巨杉较近的亲缘关系(Kusumi 2000, Gadek 2000, 李春香, 杨群 2003, Brunsfeld 1994, Tsumura 1995), 而形态学分析却更加孤立水杉的地位(于永福, 傅立国 1996)。

4 对叶绿体 DNA 和 3 对线粒体 DNA 引物的序列分析中, 外类群龙柏、侧柏和刺柏始

终显示了差异性。ClustalX 软件对序列比对时，都是根据匹配的强弱程度依次加入序列，排列越靠后的序列也是越不匹配的。我们在使用 ClustalX 对各个序列的初排序中，几乎每个序列中龙柏都是排在最后一位，甚至有一个序列(trnL IGS)在总共 300 多碱基长度的序列中，龙柏和刺柏竟然缺失碱基达 200 左右，差异之大令人惊异。说明柏科虽然与杉科关系紧密，但紧密程度到底比杉科内部物种逊色了一些。在 Kusumi 等(2000)叶绿体序列聚类中，5 个柏科物种与落羽杉族和柳杉族的组合在杉科其它物种之前聚类，不过他们的外类群选用的是杉木属。

我们在对测序序列分析中，进行了单独和联合分析两种方法。联合树显示了较清晰的树型和与以往研究一致的结果，水杉的位置在序列联合建树中也更明确一些，也验证了先前的有关多基因联合建树有优势的观点(Cunningham 1997, 施苏华等 2003, Rokas *et al.* 2003)，表明联合建树还是比单基因效果好。

第三章 水杉人工种群和自然种群的遗传结构

3.1 前言

3.1.1 自然种群和半自然种群的遗传结构

对遗传结构研究较多的是自然种群(natural population), 这些种群没有受人类有意识的培育、管理, 它们在各自环境中长期进化成了各自的遗传组成和种群结构。有些种群自然生长, 但受人类的干预, 比如就地保护或者培育果实, 称为半自然种群(semi-natural population)或管理种群(managed population)。

种群的遗传结构决定了它对环境长期适应能力的高低。自然种群的遗传结构由多种因素相互作用决定, 如基因流、随机遗传漂变、自然选择、个体或种群的空间分布等等(Sato *et al.* 2006)。对种群遗传多样性的研究一般可采用多态位点百分比、每个位点的有效等位基因数目、多样性指数(Hamrick *et al.* 1979)以及杂合度(Spielman *et al.* 2004)等方法。研究种群遗传分化可通过 Wright 的 F-统计、AMOVA 分析、Nei's 遗传距离等几种方法(Dyer & Nason 2004)。

植物一般保持了相对较高的遗传变异水平, 其遗传多样性相当于无脊椎动物的水平, 而比脊椎动物高许多(Hamrick *et al.* 1979)。等位酶的数据显示, 植物种内遗传多样性指数(H_S)为 0.230(Hamrick & Godt 1989), 与 RAPD 获得的遗传多样性指数相似(0.214)(Nybom & Bartish 2000)。基于等位酶数据得出的种群间遗传分化指数(G_{ST})为 0.22(Hamrick & Godt 1989), 而 RAPD 数据得出的种间遗传分化为 0.35(AMOVA)或 0.29(G_{ST})(Nybom & Bartish 2000)。等位酶、RAPD 与 STMS(SSRs)标记都显示, 长生活史、异交、处于演替后期阶段的植物种类在种群内保持了大部分的遗传变异水平, 相反, 一年生、自交和或处于演替早期阶段的植物种类种群间的遗传变异占的比例大一些(Nybom 2004)。Hamrick(1989)的研究也证明植物类群中木本植物比草本植物的遗传变异大, 热带木本植物由于广泛的传粉和种子传播机制也保持了与木本植物针叶类相同的较高的遗传变异水平(Hamrick 1989)(表 3.1)。如 Ledig 等(2005)对云杉(*Picea breweriana*)的种群遗传结构进行了详细的研究, 用 26 个等位酶位点分析了 10 个云杉种群。比起其它乔木树种和草本植物, 云杉的遗传多样性很高(Ledig *et al.* 2005)。种子植物中, 通常裸子植物的遗传多样性比单子叶植物和双子叶植物都高, 遗传分化比其它 2 类植物低(Nybom & Bartish 2000)(表 3.2)。

表 3.1 几个植物类群等位酶的遗传变异(Hamrick 1989)

Table 3.1 Allozyme variation in several plant groups (Hamrick 1989)

类群	研究数目	多态位点百分比	等位基因数目	平均杂合度
Taxon	Number of studies	Percent polymorphic loci	Number of alleles	Mean heterozygosity
热带树	16	60.9	-	0.211
针叶树	20	67.7	2.29	0.207
双子叶植物	74	31.2	1.46	0.113
所有植物	113	36.8	1.69	0.141

表 3.2 植物不同种类的遗传变异(Nybom & Bartish 2000)

Table 3.2 Genetics variance in different taxa of plants (Nybom & Bartish 2000)

类群	研究数目	种群内遗传多样性	研究数目	遗传分化系数
Taxon	Number of study	H _{pop}	Number of study	G _{ST}
裸子植物	5	0.386	6	0.18
单子叶植物	9	0.190	6	0.31
双子叶植物	27	0.191	19	0.32

植物保持较高的遗传多样性是和植物特征分不开的：一是由于植物不能移动，因此它们用一种粗放的方式响应环境，即多种基因型，也就是高水平的遗传多样性；二是植物种群的数目通常很大而且相对稳定，特别是处于演替后期的多年生种类，以便最小限度地受遗传漂变影响；还有就是平衡选择的多种格局导致植物保持了遗传变异水平(Hamrick *et al.* 1979)。

濒危物种由于种种原因，遗传变异往往较低。如唇形科沙生植物 *Stachys maritima* 是生长在伊比利亚半岛的濒危物种，由于受旅游业和城市化影响，上世纪该种栖息地遭受了严重的片断化，种群只剩下约 250 个残留个体。Lopez-Pujol 等(2003)证明该植物由于小种群效应和片断化影响其种群遗传多样性极低，并建议在 IUCN 的濒危物种名录中上升该物种的濒危等级(Lopez-Pujol *et al.* 2003)。继水杉之后二十世纪第二个被发现的活化石植物瓦勒迈杉(*Wollemia nobilis*)1994 年在澳洲瓦勒迈国家公园被发现时只有不到 100 株个体，Peakall 等(2003)对其种群进行等位酶、AFLP 和 SSR 分析都得到非常低的遗传多样性，他们认为小种群效应、无性繁殖是导致其种群低遗传多样性的主要因素(Peakall *et al.* 2003)。同样，在濒危植物薯蓣科 2 种 *Borderea chouardii* 和 *Borderea pyrenaica* (Segarra-Moragues & Catalan 2002)、五针白皮松(*Pinus squamata*)(Zhang *et al.* 2005)、小勾儿茶(*Berchemiella wilsonii*)(Kang *et al.* 2005)、显脉金花茶(*Camellia euphlebia*)(Wei *et al.* 2005)、独叶草(*Kingdonia uniflora*)(Ren *et al.* 2005)等都存在遗传多样性低的现象。

半自然种群受人类选择作用相对较强烈，一些特定的特征被人类所选择，因此某些性状优于自然种群。比如印度洋边的基林群岛(又叫科科斯群岛)分布着果实巨大的椰子(*Cocos nucifera*)种群，这里椰子树结的果实表现了与野生类型一致的特征。北基林岛上的种群基本上不受人类影响，但周围的主环礁珊瑚岛上人类开发生产椰肉和椰油已有 160 年的历史。人们在这里通过人工筛选优良种质品种试图提高种群的遗传特征。所以主岛上产的椰子比较重，不大但比北基林岛的果实宽，且果核大(Leach *et al.* 2003)。墨西哥中部生长的一种仙人掌(*Polaskia chichi*pe)，其果实可食用。Otero-Arnaiz 等(2003)对它的 3 类种群——野生种群、就地管理种群和栽培种群进行研究发现，管理种群和栽培种群产种快于野生种群，并且人工干预种群表现出产果量高、产果期长以及产种率快的特征。

半自然种群在人类的选择作用下，其遗传结构往往有所改变。一些对人类有益的基因型被选择，造成种群遗传组成单一化，遗传多样性不丰富。Tinoco 等(2005)对一种仙人掌(*Escontria chiotilla*)的种群进行了研究。其野生种群生长在墨西哥中部干旱半干旱的土地上，分布于热带荒漠和常绿森林，果实是经济作物，可食用。但是在墨西哥 Tehuacan 山谷的种群变成了就地管理种群，人们对结大个果实的表现型进行选择。对这种仙人掌的自然和人工

种群进行遗传分析,结果表明野生种群的遗传变异大大高于人工管理种群,人类的选择降低了人工种群的遗传变异程度(Tinoco *et al.* 2005)。不过,他们认为,种群间的基因流还比较高,部分程度上抵消了人类选择对人工种群的影响。

有时候半自然种群在长期的人工干预下,不仅遗传结构发生变化,而且有与自然种群形成生殖隔离的趋势。Otero-Arnaiz 等(2003)在 *Polaskia chichipe* 中发现,种群内人工授粉时,3 种种群都有相似的杂交成功率(37-49%),但自花授粉野生种群有约 12%的成功率,就地管理种群和栽培种群却有约两倍于它的成功率(22-27%)。3 类种群内的异交比种群间更有效,成功率最小的异交是野生种群和栽培种群间的交配。经证实种群的交配系统和种子发芽格局在人类管理下有些轻微变化(Otero-Arnaiz *et al.* 2005),表明部分生殖隔离已经在人工干预种群和野生种群之间形成。

3.1.2 人工种群的遗传结构

人工种群(artificial population)或者栽培种群(cultivated population)是人工栽种形成的种群。栽培种群格局的形成绝大部分是由人的意志决定的,所以,人工种群不论是种群格局,种群动态,还是种群遗传结构,种群的自我更新等方面势必与自然种群有所差别。一般地,根据不同的目的,人工种群的建立有以下 3 种形式:

(1)育种:育种是改良物种性状,使物种向某个性状充分发挥的一种人工选育新品种的方法,包括作物育种、果树蔬菜育种、园林植物育种、动物育种等方面。由于存在强烈的人工选择压力,这些培育出新品种所形成的种群在表型和遗传上都与野生种群有或大或小的差别。例如栽培水稻的核苷酸替换率极显著多于野生稻的替换率,并且约 1/4 的变异是有害突变,人工选择在获得目标性的同时,也提高了栽培水稻种群有害变异的频率(Lu *et al.* 2006)。

(2)生态恢复中建立的人工种群:生态恢复指恢复受破坏生态系统的合理结构、高效的功能和协调的关系,其本质是恢复系统的必要功能并使系统能够自我维持(宋永昌 1997)。生态恢复往往要从其它地点移植种子、幼苗或成体,建立新种群。如果恢复方法得当,这种把野生种引种到另一个或另几个适宜生长地区的方法,不仅增加了物种新的半自然种群的数量及分布范围,还有可能增加物种的遗传多样性。

(3)迁地保护中人工种群的建立:当一个物种受到严峻的威胁时,迁地保护(*ex situ* conservation)途径应该作为整体保护策略的一部分(Hogbin & Peakall 1999),是对就地保护措施的一个有效补充,是与就地保护平行的一项重要保护活动(Rogers 2002),是扩展种群数量的一项有力措施(Rogers 2002)。迁地保护中建立的新种群也是人工种群,是自然种群的基因库。建立过程中应更加重视种群遗传学规律,既要强调遗传多样性的扩大,又要考虑种群间遗传分化,力求新种群的遗传组成最接近野生种群。

由于受强烈的人工选择压力影响,育种过程的栽培种群某些基因优势会比较明显,但种群的遗传多样性一般不如其相应的野生种群高。Colunga-Garciamarin 等(1996)在研究灰叶剑麻的栽培个体(*Agave fourcroydes*)种群与野生个体(*A. angustifolia*)种群时,发现栽培种群的遗传多样性小于自然种群。栽培种群由于遗传多样性单一,存在的近交衰退现象导致生殖能力等方面一般来说也不如自然种群有优势,Rajaram(1998)证明 3 种苹属植物中,2 种的野生种

群生殖能力比栽培种群强，另外一种相等。灰叶剑麻的栽培种群也较自然种群个体大，纤维长，刺小并且生殖能力弱(Colunga-Garciamarin *et al.* 1996)。当开花时间等条件一致时，自然条件下栽培种群和自然种群之间会通过交配产生基因流，Nakatama 和 Yamaguchi(2002)证实了大豆(*G.max* ssp. *max*)的栽培种群向野生大豆(*Glydine max* ssp. *soja*)种群传递基因流的结果。栽培种群的基因流在一定程度上也会对自然种群产生影响，并且这种基因流有可能增加野生种群的遗传多样性。典型的例子是栽培水稻(*Oryza sativa*)的基因流改变野生稻(*O.ruffipogon*)的遗传组成。大量的研究表明在自然条件下栽培稻与普通野生稻间存在基因交流，这种交流不仅使普通野生稻种群的表型上变异显著，而且改变了野生稻种群的遗传组成，提高了野生稻种群的遗传多样性水平，并改变其遗传结构(宋志平，陈家宽 1994)。Bartsch 等(1999)发现栽培甜菜(*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*)种群有一个与瑞士甜菜和红甜菜这些栽培品种相似的等位基因，该基因在距离栽培种群较远的野生甜菜(*B. vulgaris* ssp. *maritima*)种群中非常稀少，但在靠近它野生种群中却比较普遍。由此证明当生长距离较近时，栽培种群会有对野生种类的基因流动，并且附近的野生种群遗传多样性高于较远的种群。

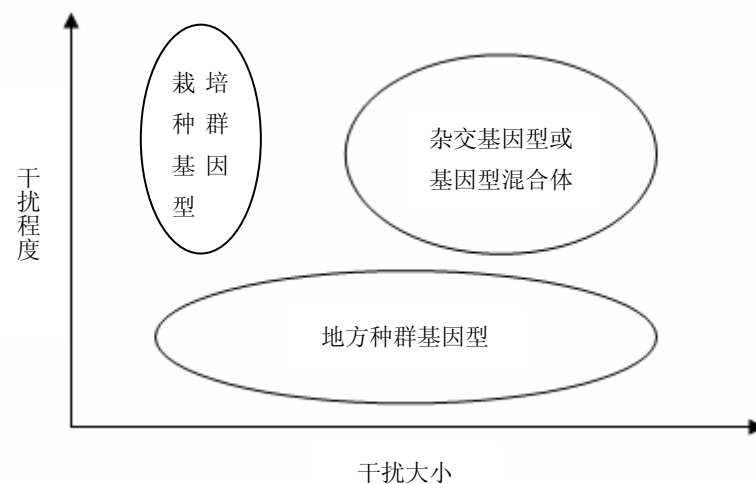


图 3.1 恢复策略中物种 3 种可能来源中干扰程度与大小的关系(Lesica & Allendorf 1999)

Figure3.1 General relationship to degree and size of disturbance of three possible sources of plants to be used for restoration projects (Lesica & Allendorf 1999)

生态恢复中建立新种群要能够在较长时期内应付环境变化，即恢复起来的种群具有生长、繁殖、迁移和适应进化变化的能力，因此，在生态恢复中建立新种群应该考虑遗传学因素(陈小勇 2000)。需要建立新种群的生态恢复，有两个阶段对新种群的遗传变异影响较大，一是引种阶段，一是新种群内部变化(陈小勇 2000)。引种是基础，它对遗传变异的影响主要是取样误差。引种如果从一个大种群取一部分个体，会有遗传变异程度降低的可能；如果从几个种群分别取样，然后把种子混在一起建立新种群，虽然增加了该种群的遗传多样性，但可能由于种质混杂，带来远交衰退。关于生态恢复过程应该如何取样才能达到最优的结果，Lesica 和 Allendorf(1999)曾详细分析过生态恢复过程中有关取样策略的问题(图 3.1)，新种群基因型的来源有地方种群(local population)、远方种群(distant population)和栽培种群(cultivars)3 个。有三种途径构成恢复种群的遗传组成：一是地方种群的基因型；二是在恢复

地域有很强适应能力的基因型；三是具有最大遗传变异的杂交基因型或基因型混合体。引种时决定选取哪种途径有两个条件：干扰程度(degree of disturbance)和干扰大小(size of disturbance)，这里的干扰大小主要强调的是范围。无论干扰范围多大，干扰程度低的时候适合引种地方种群的基因型，因为这种情况下，即使干扰范围大也对地方基因库的完整性不产生负面影响。当干扰程度和大小都较强的时候应选择种群间杂交或混合的基因型混合体，因为这些基因型组合有较高的遗传变异，可以使新种群长期适应多变的环境。当遇有强度大但波及范围小的干扰时，栽培种群的基因型是最合适的，因为它们具备针对性地适应特殊环境的能力，但是栽培种群没有长期忍受能力，所以要达到立竿见影的效果时是个不错的选择。

对植物的建立迁地保护种群的重点一般在已知或有潜在经济价值的物种上面，特别是栽培物种和它们的相关野生种(Frankham *et al.* 2002)，虽然后来对濒危植物投入的保护力量越来越多(Falk & Holsinger 1991)，但对濒危物种的研究大多停留在就地保护的种群中，对迁地保护所建种群一般是提出建议的比较多。仍有一些研究表明，濒危物种迁地保护中建立的新种群受取样效应和小种群效应影响，易遭受近交衰退，遗传多样性不比自然种群高。如夏威夷的乡土植物桔梗科*Brighamia insignis*和*B. rockii*处于濒危状态，等位酶分析它们的迁地保护种群相比于野生种群有较低的遗传变异，可能是随机事件如遭遇多次瓶颈效应，或是生物方面如小种群和交配系统类型，以及历史影响如引种的时期等方面原因所致(Gemmill *et al.* 1998)。不过在合适的取样设计下迁地保护的种群也有较高遗传多样性，比如埃及的乡土种唇形科3种植物*Ballota undulata*, *B. kaiseri*和*B. saxatilis* (Zaghloul *et al.* 2006)以及产于我国三峡库区河滩上的疏花水柏枝(*Myricaria laxiflora*)(Liu *et al.* 2006)的迁地种群就保持了高遗传多样性。

大多植物迁地保护过程中主要问题是用于储存和繁殖的种子的取样情况(Frankel *et al.* 1995)。取样的两个特点是取样大小以及确保所收集的样本具代表性而又要包括该物种的全部遗传多样性(Frankham *et al.* 2002)。取样效应造成迁地种群遗传多样性的丧失，尽可能地减少这种丧失是非常有必要的。但样本的代表性也非常重要，至少在植物中比动物重要，因为植物有自交现象，各种群间常常分布着较高的遗传多样性，取样时应该保留这种种群间合适的遗传分化程度(Frankham *et al.* 2002)。Falk和Holsinger(1991)建议取样时从5个隔离的种群中分别取10-50个个体，每个体1-20粒种子。

3.1.3 微卫星方法在种群遗传学研究中的应用

微卫星或简单重复序列(SSRs)是在原核生物和真核生物染色体中发现的含1-6个碱基的重复序列。它们在编码和非编码区都存在，并且片段长度的多态性很高。造成这种多态性的原因大多认为是DNA复制过程中的滑动事件(Schlotterer & Tautz 1992)，但其真正原因还有争议。虽然微卫星进化的机制还不明确，然而由于高变异性，在它首次提出后就在许多领域广泛应用起来。微卫星在许多生物的基因组图谱描述中被证明是一种很有价值的工具，它们的应用覆盖了从古DNA和法医鉴定到种群遗传和生物资源保护与管理的各个领域(Jarne & Lagoda 1996)。

由于它们巨大的应用性，近几年有关微卫星应用的文章大量的发表反映了人们对SSRs的兴趣有了极大的提高。在多种种类中描述微卫星引物的筛选的报道越来越多，并且相关刊

物《Molecular Ecology Notes》的创建,都表明 SSRs 的普遍应用(Zane *et al.* 2002)。

微卫星的主要缺点是大多数物种中首次筛选的微卫星需要重新分离。这是因为:微卫星通常在非编码区发现,而非编码区的核苷酸替代率高于编码区。因此,设计匹配保守序列的通用引物的方法(这对于线粒体 DNA 是很有效的(Kocher *et al.* 1989))对于微卫星来说很有困难(Zane *et al.* 2002)。

尽管如此,微卫星标记还是经常用于分析种群的遗传结构(Balloux & Lugon-Moulin 2002, Selkoe & Toonen 2006)。Marquardt 和 Epperson (2004)用 7 个微卫星位点估计了北美白松(*Pinus strobus*)第一代和第二代栽种种群的遗传结构。SSRs 结果显示每个种群的遗传多样性较高,自交现象较低,种群之间的遗传分化较小。此外还有十字花科的 *Boechera stricta* (Song *et al.* 2006)、鹰嘴豆属的 *Cicer reticulatum* (Sethy *et al.* 2006)、挪威云杉(*Picea abies*) (Nascimento *et al.* 2005)等研究。

对濒危物种的研究也大量地应用了 SSRs 分子遗传标记。普通野生稻(*Oryza rufipogon*)是重要的农业作物,但是它面临着严重濒危的危险。Gao(2004)用 6 个微卫星多态位点研究了覆盖中国大部分野生稻分布区的 47 个自然种群 1245 个个体的遗传变异,以便能更好探究遗传结构如何在物种的保护前景上应用的问题。他们通过研究认为遗传结构的保护和恢复应重点放在维持种群的历史进程上,比如说保持高水平的异交和基因流,以及大的有效种群数目。Novick 等(2003)用 SSRs 研究了中美洲的大叶桃花心木(*Swietenia macrophylla*)种群的遗传结构。大叶桃花心木是新热带区的一种濒危植物,最近被列入 CITES,在它分布本土区域有灭绝的危险。他们用了 7 个微卫星位点对 6 个中美洲国家的 8 个种群进行了遗传多样性和种群遗传结构的估计。结果显示在大多数种群间存在较大的遗传分化。地理距离与遗传分化有巨大的相关性,说明区域生物地理和距离隔离起了重要作用。他们认为从结果中也可以推测出大叶桃花心木复杂的生物地理学历史(Novick *et al.* 2003)。

3.1.4 水杉种群遗传结构研究进展

自从水杉被发现以来,科学界对水杉的研究不断深入,首先是从水杉的生长环境状况开始的。1950 年,水杉刚被发现不久,我国科学家曲仲湘先生和美国科学家 Cooper 就特意到水杉的故乡做过生态调查(Chu & Cooper 1950); Polman 等(1999)研究报道了 1957 年引种到荷兰的水杉的生长特征;我国科学工作者刘艳菊等(2003)对水杉的发现、传播以及研究进展做过综述;Ma(2003)对世界各地有关水杉自发现以来到现今(1943—2003)60 年间的重大活动做过详细的总结。

一批国内的科学家和水杉保护区基层工作人员凭借大量的实地种植经验,对水杉的生物学特性进行了详尽的描述。从水杉的发芽(廖绍忠,周万良 1989)到育苗(马常耕,程长元 1992,张素舫,崔泽军 1997,郭宏伟等 2002,王定胜 2002),再到发育特性(张卜阳,张丰云 1980),以及解剖学特征(马清温,张金保 2003)都做过大量的研究。另外,还有人对水杉的木材及病虫害(陈德平 1995,方升佐等 1995,李志辉等 1996)等方面进行过报道。同时,对杉科的系统发育研究一直在进行着。

从遗传角度对水杉种群的研究历史有十几年,有关报道也不少,得到的结论大都是水杉自然种群遗传多样性水平不高。Kuser 等(1997)用等位酶方法分析水杉自然种群和栽培种群

的遗传多样性, 1990 年采自自然种群的水杉的多态位点百分率为 20%, 阿诺德植物园 1947 年种植的水杉多态位点百分率为 13.3%。其它遗传变异参数, 自然种群都高。李晓东等(2005)利用 9 个等位酶系统的 23 个酶位点对 8 个水杉种群的遗传多样性检测, 结果表明水杉自然种群遗传多样性较低, 栽培水杉种群的遗传变异比自然种群低。

李春香等(1999)用 RAPD 方法对水杉自然种群的 27 个个体进行遗传多样性分析, 11 条引物共获得 121 条带, 多态性条带比率为 53%, 认为有中等变异水平。李晓东等(2003)同样用 RAPD 方法对水杉自然种群和人工种群的遗传结构进行过研究。他们采用 16 条随机引物共得到 57 条条带, 对水杉 6 个自然种群和 2 个人工栽培种群的 48 个个体进行了遗传多样性分析。结果表明, 水杉种群遗传多样性较低, 多态性条带为 38.6%, 人工种群比自然种群遗传多样性低。史全芬等(2005)利用 RAPD 标记, 对 9 个水杉种群遗传多样性研究, 结果表明, 水杉栽培种群的遗传多样性略低于自然种群, 涵盖了自然种群近 80% 的遗传多样性, 他们认为人工种群种源是混合的。我们前面也做过水杉遗传结构的分析工作(Li *et al.* 2005), 利用 RAPD 方法对水杉自然种群 81 个个体和人工种群 64 个个体进行种群遗传分析。结果表明: 水杉自然种群的种内遗传多样性指数 $H_s(0.2341)$ 低于一般的裸子植物(0.386), 水杉人工种群的遗传多样性略低于自然种群。结论是, 尽管水杉的数量和分布区域已经成功恢复, 但其种群的遗传结构还未恢复。

李作洲等(2003)采用空间自相关分析方法对水杉自然种群 AFLP 遗传变异的空间分布特征及其形成机制, 他们认为水杉子遗种群缺乏空间结构。

水杉从数量和分布范围来看已经恢复成功, 但是它恢复种群的遗传结构是否得到有效恢复还需进一步证明。尽管对水杉遗传多样性的研究已不鲜见, 但大都样本量偏少, 对自然种群和人工种群的对比研究不多, 利用微卫星分析未见报道。我们的研究以微卫星为标记对水杉人工种群和自然种群的遗传结构做一对比。

3.2 材料与方法

3.2.1 研究材料

采样工作于 2001 年至 2003 年进行, 自然种群在湖北利川县、湖南龙山县和重庆石柱县采集。

在利川县北部谋道镇东南凤凰山下生长着该镇唯一一株水杉树, 被誉为“天下第一杉”、“水杉王”, 这是我国发现的第一棵水杉树, 也是鉴定的模式标本。这株树古老沧桑、龙骨虬枝、高大挺拔, 树高 35 米, 胸径 2.5 米, 冠幅 22 米, 树龄达 500 多年。它是世界上树龄最大、胸径最粗的水杉母树(http://www.hb28.com/Info/Info_Detail.aspx?Info_Id=1897)。

利川县中部忠路镇、凉雾乡是野生水杉树生长较为密集的一个地方。采集了忠路镇的桂花村、小河村、兴国村, 凉雾乡狮子坝水杉种群。还采集利川东南毛坝乡杉木村的水杉自然种群。采样时为了避免采到人工栽培的水杉古树, 稻田、道路、居民区附近的小溪旁, 排列整齐的水杉树(Chu & Cooper 1950)不采集。

湖南省龙山苗族土族自治县的洛塔镇只分布 3 株古老的野生水杉个体, 它们的胸径在 118-178cm 范围间。其中 2 株位于一个村旁的山坡上, 相隔约 5 米; 另一株在距离 4km 之外的村子里, 这两个村子之间有一座山。我们采集了这里的全部 3 株野生水杉树。

重庆市石柱土家族自治县的黄水国家森林公园内散生着 24 株野生水杉树。但在我们调查中发现这里的大部分古水杉树有可能是在 1940 年水杉发现前就栽种于此的，不过既然许多植物学家们把它们作为野生种群，我们暂且这样确定。

我们又选取了 4 个人工种群，分别是南京、上海、杭州和金华种群。

所有采集种群分布地点详见下图及下表。采集过程中收集植物鲜嫩的叶片，马上带回实验室放入-70℃超低温冰箱中待实验，或者路途较远的用硅胶干燥后带回实验室。

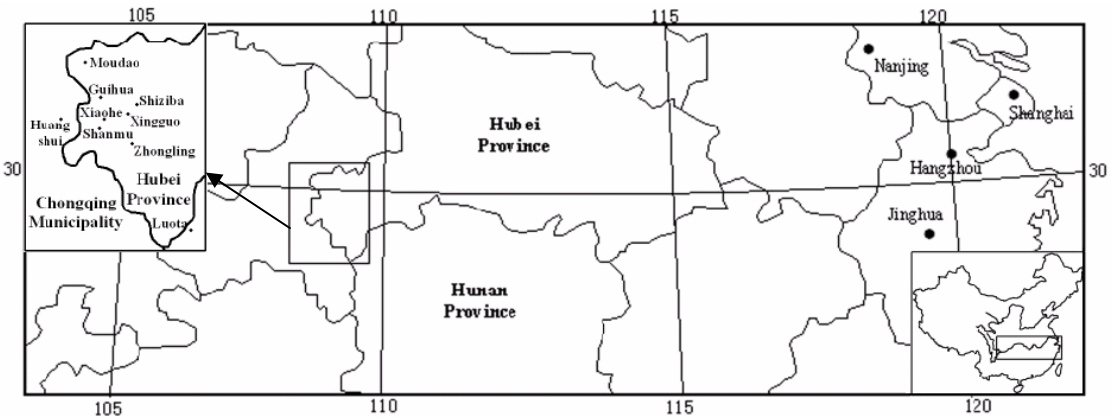


图 3.2 水杉的采样地点

Figure 3.2 Sampling sites of *M. glyptostroboides* populations

表 3.3 水杉的采样地点

Table 3.3 Sampling sites of *M. glyptostroboides* populations

地点	缩写	样本数	坐标
Site	Abbreviation	Number of samples	Latitude and longitude
自然种群			
湖北利川县谋道镇	MD	1	29°41'~30°39'N, 108°21'~109°18'E
湖北利川县忠路镇桂花村	GH	27	
湖北利川县忠路镇小河村	XH	14	
湖北利川县忠路镇兴国村	XG	11	
湖北利川县忠路镇钟灵村	ZL	5	
湖北利川县凉雾乡狮子坝村	SB	3	29°25'N, 109°30'E
湖北利川县毛坝乡杉木村	SM	14	
湖南龙山县洛塔镇	LT	3	28°10'N, 105°17'E
重庆石柱县黄水镇	HS	10	
人工种群			
江苏省南京市	NJ	17	32°37'N, 118°22'E
上海市	SH	15	31°14'N, 121°29'E
浙江省杭州市	HZ	16	30°16' N, 120°12'E
浙江省金华市	JH	23	28°32'N, 119°14'E

3.2.2 总 DNA 提取

用鲜样或干样进行 DNA 提取, 采用 CTAB 法, 在 Doyle & Doyel(1987)的方法基础上修改而成(Fan *et al.* 2004)。提取方法和程序与第二章相同。

3.2.3 微卫星分析

3.2.3.1 引物的选择

选取水杉近缘种日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)的微卫星引物进行预实验(Moriguchi *et al.* 2003, Tani *et al.* 2004), 预实验 56 对引物见表 3.4。水杉是古老的树种, 进化上也比较独特, 所以日本柳杉的微卫星引物用于水杉上大部分都扩增无结果, 有些有结果的效果也不太好, 我们从预实验的 56 对引物中选取了 7 对在水杉中扩增出条带, 并且条带清晰可辨且多态的引物用于水杉的遗传结构实验(表 3.4)。

3.2.3.2 PCR 扩增程序

(1) 实验仪器与药品

PTC220 型 DNA Engine PCR 热循环仪(MJ research, USA); Eppendorf 微量移液器(Eppendorf, Hamburg, Germany); AG 5417R 型高速冷冻离心机(Eppendorf, Hamburg, Germany); Gel Doc2000™凝胶图像系统(Bio-RAD, California, U.S.A.)。

表 3.4 预实验中微卫星引物的序列及 PCR 扩增条件(Moriguchi *et al.* 2003, Tani *et al.* 2004)

Table 3.4 Primer sequences of microsatellite markers and PCR conditions in pre-experiment (Moriguchi *et al.* 2003, Tani *et al.* 2004)

引物名称 Primers	重复单元 Motif	引物序列(5'-3') Sequence of primer	退火温度(°C) Anneal temperature	片段长度(bp) Size
<i>Cjgssr01</i>	(CT) ₃₁	TAATGCACCTAGCTAGACTTG AAATGAGGGAGTGATAGTTGT	58	693
<i>Cjgssr05</i>	(GA) ₁₂	CAAGGTGTGGCAGAGCTGAC GTCCTTTCTCCTCCACCGAATC	65	133
<i>Cjgssr07</i>	(TC) ₁₅ A(TC) ₆	ATCAAATGTGAAGCAAACAGT AGAGGGAAGAGGAAGATAAAGA	60	125
<i>Cjgssr26</i>	(TC) ₃ TG(CT) ₁₀	ACTTTTTGCTCTACCTCACAT GCAGAAAGTAGAGAACAAGAAC	60	190
<i>Cjgssr30</i>	(CT) ₁₁	TCAACATGCTACTATCAACACT TGGTGGGAGAGACCTAGA	60	130
<i>Cjgssr31</i>	(CT) ₂₃	TCTCTCAATATCCCCTTATTCT GGGGATATAGGGATGTATGG	60	145
<i>Cjgssr33</i>	(GT) ₂₁	GGTGGTGTAGAGTTGTCACTT AATTGTCGTTGATTGCTACTTA	62(54)	181

<i>Cjgssr39</i>	(GA) ₁₅	GGGATAGAGAGCGATAATATAA TCCTTGTTTTTAATTCCTTTC	60	190
<i>Cjgssr47</i>	(TC) ₁₉ TT(TC) ₄	GAAAGAGAGGAAGAGACCATAG CCTTGCATCAACCTCACT	60	235
<i>Cjgssr77</i>	(CT) ₁₀	CCTTGTACACTTATTTGTACCT AGGGAGGAGAAATAGACAT	60	106
<i>Cjgssr78</i>	(GA) ₂₁	AGGGAGGAGAAATAGACAT AAGAAGGCATCCAAGAGTGA	60	157
<i>Cjgssr81</i>	(TC) ₁₀	TTTCCCTCCTATTCTTTCATTA TTATGAGAGGTTGAGAGTGTTG	60	161
<i>Cjgssr83</i>	(CT) ₂₅	GTGGAGTGCTTTCATACTTATT GCTCAGACAAGAGACAACA	60	170
<i>Cjgssr95</i>	(AG) ₁₁ G(GA) ₃ G G(GA) ₃	ATGGATAGAGATTGAGAGAAAG TCTCCCCCACTCTCTTAC	60	146
<i>Cjgssr101</i>	(GA) ₂₄ GG(GA) ₉	AGGGATAGAAAATAGAAGAAGG GTTCTCTTGCATGTTAT	55	167
<i>Cjgssr120</i>	(CT) ₂₁ CC(CT) ₆	GGGACTTCCCTCCTTTTG AGGACGAACATCATGTAGAAGA	60	230
<i>Cjgssr121</i>	(CT) ₂₅	TAGCCATTGTTTTTCATATTTG TGCAACTCTGAAATCCTTTTA	60	205
<i>Cjgssr122</i>	(TC) ₂₅	CCTCATACCCTTTAGTTGACAT GGCACTCATACCCAAAGTAAT	62	198
<i>Cjgssr123</i>	(AG) ₃ G(AG) ₂₂	TCCATATTACTCTTGCTCAATC AGATGGAGAGGTAGAGATGAA	60	172
<i>Cjgssr125</i>	(CT) ₁₈	TCTCTGTATATCTCCCACAATC AGGGAAATAGAGGGAAATAGT	60	142
<i>Cjgssr130</i>	(CT) ₁₃	TCCCTCCCCATCCATCTC GGGTATCATCAAGCCAAAACAA	60(61)	141
<i>Cjgssr140</i>	(CT) ₂₁	GGGAAGAGGGAAAGAGTTCAT GGAGTGGGAGAGAGGTGAG	60(46)	199
<i>Cjgssr142</i>	(GT) ₉ (GA) ₂₁	ACCCAATTTTATAGTGACTCCA CGCATCAACTCGACATAATATC	62(53)	261
<i>Cjgssr149</i>	(GA) ₁₁	GGCAACACTAGGGACAACA AGATTGGGAGGAGGAGTATTTA	60	120
<i>Cjgssr159</i>	(CT) ₂₃ (CA) ₂₀	CCACCATTCTCATTTTGTA GGGAGGAGATAGCTTGTAAGTA	60	227
<i>Cjgssr175</i>	(CT) ₁₆	ACCCTTTGAATTATTCCTTGAG AGCGGAAAAAACTACATCAGA	62(46)	186
<i>Cjgssr177</i>	(TG) ₁₀ (GA) ₁₁ A (AG) ₃	ACCGGTATAACTGTAGTAGGTC ATTCTTGGTCTCTCTTCTTTC	60	163

<i>Cjgssr181</i>	(AG) ₃ G(GA) ₂₃	AGAGGGAGGGAGGAATACAT GGCTGAGAGTTTAGGGTTTACA	60	240
<i>Cjgssr193</i>	(CT) ₁₅	CTATCTAGTTCCTGCGCAATTC ATGGAGAGTAGCAGAGAAGTT	63	166
<i>Cjgssr124</i>	(CT) _{36+α}	AAAATGGGTCATGTCATGT CATTCTCCATCTCACTACCTAT	60	200
<i>Cjgssr170</i>	(CT) _{33+α}	TGGCGATGTGGTCTTATGG CAACCGCATCTTCCCTAATTC	64	219
<i>Cjgssr13</i>	(CT) ₁₃	GTCGGGTCCAAGTCAACTAGAA GGGAGACAGGGAGGTATGTAGA	64	270
CJS0537	(GA) ₃₄ (AG) ₆	ATGAAGGGAATGATTGATGG TCTCTCACTTGGGTCTCTC	55	163
CJS0838	(GT) ₂₃	TATGTAGAAGCGTGTGATGT GATAATTGCCTTTGTGTCC	58	170
CJS0955	(TCT) ₄ (GA) ₂₉	CACACTCCCCGTCTCCGACAG ACCCTGATTCCCCATACACC	58(53)	137
CS1219	(GT) ₁₀	AAGGTGTTGTTTAAAGGAGG CAGCCATCTATTATTTGTGC	60	103
CS1226	(GA) ₁₄	CTCTAGTCCTCAATGGTGGT TATTAAGCATTTTCCCTCTC	60	139
CS1281	(CT) ₁₅	CCCCCTCTCATTAGTTACCA CAAAAATCAACAAGCCAACC	60	233
CS1289	(AC) ₂₆ (A) ₂₆	CATCCACCACTAAATACAAC TCGCTATCCCTTGCCTATCC	60	147
CS1364	(AC) ₇	TGATTATGGTCGGTGGTCTT GTGATGTGGTGTATCTTGT	62	297
CJS0002	(TC) ₁₂ (TC) ₁₇	CTTTTTTCAAATTTAGTGATGT CCCATGCCCCACTGTCCACC	55	237
CJS0520	(TG) ₁₈	TCCCTTTTGGTATTTTACAC ACTCAAATTGCGATAATCTC	55	196
CJS0527	(GA) ₁₈	ATAGAAGAAGAGAAGTAGGG TCATATCGTGTCATGTGTCC	55	103
CJS0091	(GA) ₄₃	GAGAGATAAGAGGGTAGAGGT CAATGCCAACTTAGAAGAC	60	298
CJS0331	(GA) ₆	GGAGAGATAGACGACAAAAGAG CCATCTTGCTAATCTGTCC	60	245
CJS0333	(GA) ₂₆	AGGAGATTAGGATGGTGGG GGTTTGCCTCTTCTATGAG	60	264
CJS0336	(GA) ₁₁ (GA) ₄₀	CCTTAGAAAGCTATGCCAC GCAACGCATCCATAATACC	60	259
CJS0155	(CT) ₂₀	GTTACTTTGAAAAATGAGCC AACATCAAGATTAAAGGGAC	58	166

CS1450	(TG) ₉	GGCATTAAACCATCAAGACA AGTTGGGCAGAGATCATAAG	62	401
CJS0268	(AC) ₅₃	CCTTAGAAAGCTATGCCAC GCAACGCATCCATAATACC	60(43)	352
CJS0356	(GA) ₆₄	CTAAAGAATAGATGACTCCAC TATAACGCTTTTGCCCTCA	60	337
CJS0401	(CG) ₈ (GA) ₅₄	GATCTAAACTTGAGCATAAC CAATCCTGTCTCCATACCC	55	222
CJS0584	(AG) ₈₀	TGGTTTGCCTTTGGTTGCTC GGACTTTCTATTTACCTCTTGG	60	329
CS1218	(GT) ₁₃	CATCACATACAAATAGCACC GAAGATTGTCTCACGCACTC	60	332
CJS0686	(GA) ₅₂	ACATGCAAATATAAGTTCACCC TCCACCTCTTTTTCATTCTC	55	275
CJS0665	(GA) ₄₅ (GA) ₂₉	CCAAGCATAGGGAAAAAGAG GGGGAGTAAGGATGACATTT	60	367

注：表中黑体代表所选择用于正式实验的引物；退火温度括号中是水杉实验所用的温度。

所有引物均由上海生工生物工程公司在美国 PE 公司 391 型 DNA 自动合成仪上合成，加 dH₂O 至使用浓度 4μM；Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等均购自上海生工，其中 10×PCR 反应缓冲液和 25mM MgCl₂ 由 Taq DNA 聚合酶厂家赠送。

(2) 10×PCR 反应缓冲液

100 mM KCl; 80 mM (NH₄)₂SO₄; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; NP-40。

(3) 1×PCR 反应体系(总反应体积为 20μl)

Primer1 0.3 μM

Primer2 0.3 μM

1×PCR 反应缓冲液

模板 DNA 30 ng

1.875 mM MgCl₂

200 μM dNTPs

1 单位 Taq DNA 聚合酶

加 dH₂O 至总体积 20μl

(4) PCR 反应程序

94℃ 5 min DNA 模板预变性 1 cycle

94℃ 45 sec DNA 模板变性

T_m 45 sec 退火，引物与模板结合；

72℃ 1min 延伸

35 cycles

72℃ 10 min 延伸 1 cycle

3.2.3.3 电泳检测

采用 8%的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳检测微卫星产物。

(1) 实验仪器与药品

DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂, 北京); DYCZ-28B 型双板夹芯式垂直电泳槽(北京市六一仪器厂, 北京); Gel Doc2000™凝胶图像系统(Bio-RAD, California, U.S.A.)。pUC19 DNA/Mspl Marker(SM0221, 上海生工生物工程技术有限公司, 上海)。

(2) 8%聚丙烯酰胺凝胶配方(200×125×1.5mm)

40% 丙烯酰胺(39:1)	20ml
10×TBE	10ml
尿素	12g
10%过硫酸钾	1ml
dH ₂ O	51.25ml
TEMED	106μl

凝胶至少 2 小时后方可使用, 使用前先空样预电泳约 10 分钟, 使胶预热、跑匀。

(3) 电泳

用微量进样器取 6μl 扩增产物至加样孔中, 100V 电压下电泳 10 小时。

(4) 银染

把胶从电泳槽上拆下后放在蒸馏水中洗两遍, 各 5 分钟; 放入 1%的硝酸银染色液 15 分钟; 拿出后再用蒸馏水洗涤两遍, 各 1 分钟; 0.5%氢氧化钠和 0.019%四硼酸钠和 0.4ml 甲醛显影至条带出现, 放入清水中待判译。

3.2.3.4 电泳图谱的遗传判译

微卫星为共显性标记, 理论上一个二倍体个体中因只有两条 DNA 链, 因此最多只能表现出两条长短不同的条带。可以以此判断研究个体的两条 DNA 链是否一致, 即电泳一条带时可判断两条 DNA 链的序列长度相同(纯合), 两条带时可判断两条 DNA 链序列长度不同(杂合)。

3.2.4 数据处理

3.2.4.1 Hardy-Weinberg 平衡检验

在一个随机交配的种群中, 大家共享一个基因库, 这个互交繁育的种群被称为“孟德尔种群”。常用来解释孟德尔种群在遗传学上的种群结构的统计模式即“Hardy-Weinberg 平衡”。它是由英国数学家 GH. Hardy 于 1908 年和德国医生 W. Weinberg 于 1909 年先后独立证明的, 即在没有选择作用、突变、漂变、迁徙等情况下, 在一个很大的随机交配的种群中, 各等位基因的频率将世代保持恒定, 或基因型频率至多在第二代以后将达到恒定, 即保持一个稳定的平衡。如果测得的数据与 Hardy-Weinberg 平衡预测的结果不一致, 说明种群中的繁殖方式不是随机交配的, 或出现了选择作用、突变、漂变、迁徙等作用。通常用卡方拟合度检测(chi-square goodness-of-fit test)进行 Hardy-Weinberg 平衡检验(Pasteur 1988)。

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

O——观察到的不同基因型的个体数，E——预期的不同基因型的个体数。

该参数采用 Genepop v.3.4 (Raymond & Rousset 1995)完成。

3.2.4.2 平均等位基因数目(A)

平均等位基因数目即各位点含有的等位基因数目的算术平均值。计算公式为：

$$A = \sum_{i=1}^n A_i / N$$

A_i ——第*i*个位点上的等位基因数， N ——所测定的位点的总数。

该参数采用 FSTAT v.2.9.3.2(Goudet 2001)完成。

3.2.4.3 等位基因丰富度(Alellic Richness, A_R)

等位基因丰富度又称等位基因多样性(allelic diversity)，或各位点的平均等位基因数(mean number of allele per locus, MNA)，它是独立于种群大小的一个指标，所以此指标可用于比较不同种群大小的等位基因数目。 A_R 是某个位点总的 $2N$ 基因中，在某样本 $2n$ 个基因(一个特定的取样大小)内取到不同的期望等位基因数目($N > n$)(Petit *et al.* 1998)：

$$A_R = \sum_{i=1}^n \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

N_i ——在 $2N$ 基因中第 i 个等位基因出现的次数。

该参数采用 FSTAT v.2.9.3.2(Goudet 2001)完成。

3.2.4.4 杂合度(Heterozygosity)

观察杂合度(H_O)即平均每个位点的实际杂合度，也就是我们观察到的杂合子比例(Nei 1978)。计算方法：

$$H_{O_i} = 1 - \sum_{j=1}^{m_i} Q_{ij}$$

Q_{ij} ——第*i*个位点上第*j*个等位基因纯合基因型的频率， m_i ——第*i*个位点上等位基因数目。

如果有*n*个基因位点被检测，它们的平均每个位点的观察杂合度(H_O)等于所有位点的观察杂合度之和除以位点总数，计算公式如下：

$$H_O = \sum_{i=1}^n H_{O_i} / n = \sum_{i=1}^n \left(1 - \sum_{j=1}^{m_i} Q_{ij} \right) / n$$

H_{O_i} ——第*i*个位点上的观察杂合度， n ——测定的位点总数， Q_{ij} ——第*i*个位点上第*j*个等位基因纯合基因型的频率， m_i ——第*i*个位点上的测定到的等位基因数目。

期望杂合度(H_E)即平均每个位点的预期杂合度，是常用的衡量种群遗传变异量的指标，表示在 Hardy-Weinberg 平衡定律下平均每个位点的期望杂合度(Nei 1978)。

$$H_{E_i} = 1 - \sum_{j=1}^{m_i} Q_{ij}^2$$

Q_{ij} ——第 i 个位点上第 j 个等位基因的频率, m_i ——第 i 个位点上的等位基因总数。

如果有 n 个基因位点被检测, 它们的平均每个位点的期望杂合度(H_E)等于所有位点的期望杂合度之和除以位点总数, 计算公式如下:

$$H_E = \sum_{i=1}^n H_{Ei} / n = \sum_{i=1}^n \left(1 - \sum_{j=1}^{m_i} Q_{ij}^2 \right) / n$$

H_{Ei} ——第 i 个位点上的期望杂合度, n ——所分析的位点数, Q_{ij} ——第 i 个位点上第 j 个等位基因的频率, m_i ——第 i 个位点上等位基因的总数。

该参数采用TFPGA v.1.3 (Miller 1997)软件完成。

3.2.4.5 固定指数和杂合性基因多样度的比率

近交系数是一个个体在某个基因位点上从上代得到两个等同的等位基因的几率, 这两个等同的等位基因必须是来自同一个亲本的同一个等位基因的两份完全相同拷贝。

如果一个指定位点只有 2 个等位基因, 而且给出了这 2 个等位基因的频率, 近交系数 F 可用下公式算出:

$$F = 1 - H / 2pq$$

这里的 $2pq$ 即为按照 Hardy-Weinberg 平衡期望的杂合子比率, H 指的是观测到的杂合子的频率。如果有多个位点, 有 2 个以上的等位基因, 在一个种群中的近交系数 F 的计算公式如下:

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_O}{H_E}$$

H_O ——实际杂合子比率, H_E ——期望杂合子比率。

该系数的平均值被 Wright 称为“固定指数”(fixation index), 由于单态位点无所谓“杂合”、“纯合”, 只有多态位点才能计算固定指数。所以 F 也被称作“多态位点的固定指数”, 或“杂合子缺乏系数”(coefficient for heterozygote deficit)。

在一个非随机交配的种群中, 观察杂合度不等于期望杂合度, 实际的等位基因频率就会偏离 Hardy-Weinberg 平衡。如果杂合子过多, F 就会出现负值, 全部杂合时 $F=-1$; 如果杂合子缺乏, 纯合子过多, F 就会大于 0, 全部纯合时 $F=1$ 。因此, F 值变动于+1 和-1 之间。如果 $F=0$, 说明实际等位基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡, 该种群是随机交配的。这个指标反映了多态位点的基因频率偏离 Hardy-Weinberg 平衡期望频率的程度(Nei 1987)。

F -统计量由 Wright 首先提出, 后 Nei(1977)将其定义为“杂合性基因多样度的比率”。 F -统计量的基本公式是:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

式中, “ F_{IT} ”表示个体相对于总种群的固定指数, 总体上表示总种群中基因型的实际频率和理论预期频率的差异。“ F_{IS} ”表示个体相对于它所在的种群的固定指数, 总体上表示一个种群中基因型的实际频率和理论预期频率的差异。而“ F_{ST} ”则表示随机取自每个种群两个配子间的相互关系, 它用来测量各个种群间的遗传分化程度。 F_{IT} 和 F_{IS} 可以是正值, 也可以是

负值，而 F_{ST} 总是正值。当种群间没有分化时， $F_{ST}=0$ ；当 $F_{ST}=1$ 时，说明种群间的等位基因完全不同。

该参数采用 FSTAT v.2.9.3.2(Goudet 2001)完成。

3.2.4.6 基因分化系数

在平均期望杂合度(H_E)概念的基础上，Nei(1977,1987)在其基因多样性指数分析中认为，对每个多态位点来说，一个“种”的所有“种群”的总基因多样性指数(H_T)包括各种群内的基因多样性(H_S)和各种群间的基因多样性(D_{ST})，也就是说将总基因多样性(H_T)分解为各种群内基因多样性(H_S)和各种群间基因多样性(D_{ST})。对任何一个位点来说，它们之间的关系可表示为：

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

存在于各种群间的基因多样性的比率可用下述公式推算：

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Nei(1977)把 G_{ST} 称为“基因分化系数”(Coefficient of gene differentiation)， G_{ST} 值的范围 0-1。当种群间几乎没有分化时， G_{ST} 的值接近于 0，因为各种群的所有等位基因的频率几乎相同($H_T=H_S$)；上述公式中的分子 $H_T-H_S=0$ 。当各种群间分化加大时，各种群内的基因多样性在总种群基因多样性中所占比例变小，上述公式中的分子趋向于 $H_T-H_S=H_T$ ，两者相除后 G_{ST} 的值越接近于 1，说明总基因多样性几乎全部存在于各种群之间。

这就是说， G_{ST} 从 0 到 1 值越大，表示各种群间基因分化的相对量越大。基因分化系数 G_{ST} 即种群间基因多样性占总种群基因多样性的比例，一般以 Nei's 遗传多样性测定变异在种群内和种群间的分配来计算遗传分化程度。

Nei 的 G_{ST} 和 Wright 的 F_{ST} 关系密切，当一个位点只有 2 个等位基因时， G_{ST} 和 F_{ST} 相等；当有多个等位基因时， G_{ST} 等于所有等位基因的 F_{ST} 的加权平均值(Nei 1977)。

该参数采用 FSTAT v.2.9.3.2(Goudet 2001)完成。

3.2.4.7 遗传一致度与遗传距离

采用 Nei 的无偏差遗传距离计算方法(Nei 1978)。两个种群所有位点的遗传距离可表示为：

$$D = \sum_{i=1}^n d_i / n = \left(\frac{2n_x \sum x_i^2 - 1}{2(2n_x - 1)} + \frac{2n_y \sum y_i^2 - 1}{2(2n_y - 1)} - \sum x_i y_i \right) / n$$

D ——X 和 Y 两个种群在所有位点上的遗传距离， n ——所有基因位点的数目， i ——某指定位点， d_i ——第 i 个位点的无偏差遗传距离， x_i ——种群 X 中第 i 个位点的等位基因的频率， y_i ——种群 Y 中第 i 个位点的等位基因的频率。

遗传一致度的计算公式参照 Nei (1978)：

$$I = -\ln(D)$$

遗传一致度与遗传距离由软件 TFPGA v.1.3 (Miller 1997)计算。

3.2.4.8 聚类分析

聚类分析采用“UPGMA”法，该法将种群间距离定义为两个种群中成员所有成对距离的平均值，基于 Nei(1978)的遗传距离数据之上。UPGMA 方法广泛用于距离矩阵。Nei 等 (1983b)进行模拟研究了构树的不同方法，发现用基因频率数据重建系统发育树时，UPGMA 法一般能够得到较好的结果。该法的假定前提条件是基因的突变率相等(或几乎相等)。

聚类分析由软件 TFPGA v.1.3 (Miller 1997)完成。

3.2.4.9 配比检验(assignment tests)

如果知道一个种群亲本大致来源的种群，就可以根据这些种群中个体的基因型进行配比检验，从而确定每个子代个体最可能的亲本个体。鉴于人工水杉的最终来源都可归为自然种群，因此我们采用配比检验推测人工水杉最可能的自然亲本个体。

配比检验采用 GENECLASS v.2.0 (Piry *et al.* 2004)进行。该软件提供了三种计算方法，Bayesian 方法、基于频率(Frequencies-based)的方法以及基于距离(Distance-based)的方法。前两种优于基于距离方法(Cornuet *et al.* 1999)，因此我们用前两种方法进行配比正确率检验。Bayesian 方法提供 Rannala & Mountain(1997)和 Baudouin & Lebrun(2001)两种，基于频率方法采用 Paetkau 等(1995)的方法。

3.3 结果

采用 7 对微卫星引物扩增了水杉自然和人工 13 个种群共 159 个个体，其中自然种群 9 个，共 88 个个体，人工种群 4 个，共 71 个个体。7 个位点总共得到 23 个等位基因，每位点等位基因的数量范围由 2(CJS0268、Cjgssr142 和 Cjgssr33)至 7(Cjgssr130)个不等，平均每位点 3.29 ± 1.80 个等位基因。

3.3.1 Hardy-Weinberg 平衡检验

对各种群的各位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验，位点 Cjgssr175、Cjgssr142、Cjgssr33 在种群中常见等位基因为 1 个，不进行检验。其余 4 位点自然种群和人工种群中，只有 CJS0268 位点上南京种群偏离了 Hardy-Weinberg 平衡，其余都与 Hardy-Weinberg 平衡无显著差异。

表 3.5 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 3.5 Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium

	CJS0268		Cjgssr140		Cjgssr130		CJS0955	
	概率	显著性	概率	显著性	概率	显著性	概率	显著性
	<i>p</i>	Significance	<i>p</i>	Significance	<i>p</i>	Significance	<i>p</i>	Significance
自然种群								
GH	0.4512	n.s.	0.9989	n.s.	1.0000	n.s.	0.9434	n.s.
XH	0.6519	n.s.	0.9630	n.s.	0.7822	n.s.	0.6519	n.s.
SM	0.0781	n.s.	1.0000	n.s.	0.9997	n.s.	0.6519	n.s.
XG	0.2963	n.s.	0.5614	n.s.	0.9524	n.s.	0.3963	n.s.

HS	0.8421	n.s.	-	-	0.9474	n.s.	0.9474	n.s.
人工种群								
HZ	0.4351	n.s.	0.9032	n.s.	0.5656	n.s.	-	-
NJ	0.0210	<0.05	-	-	0.3428	n.s.	-	-
SH	0.2815	n.s.	0.9655	n.s.	0.8787	n.s.	-	-
JH	0.2076	n.s.	0.9778	n.s.	0.9991	n.s.	-	-

注：n.s.表示差异不显著，“-”表示该种群在该位点上常见等位基因为1个。

3.3.2 多态位点百分数

各种群的多态位点百分数请见下表(表 3.6)。因洛塔、狮子坝、谋道和钟灵 4 个种群的样本数较少，影响结果分析，所以在计算平均值时不把它们考虑在内。其它 5 个自然种群多态位点百分比都相同，而且 95%和 99%的标准下也都相同，都为 57.14%。4 个人工种群两标准下度量差别较大，平均为 95%的为 35.72%，99%标准下为 64.29%。若以常见等位基因 95%的标准来看，人工种群平均多态位点百分比(35.72%)低于自然种群(57.14%)，并且各自然种群多态位点百分比数值都高于各人工种群。

3.3.3 等位基因数目

各种群在 7 个位点的等位基因数目也见表 3.6。出现的等位基因数目最多的是金华种群，共有 17 个等位基因。其次是兴国、杉木 2 个种群，等位基因数目都为 14 个。谋道种群和洛塔种群分别只有 1 个和 3 个个体，等位基因数最少，都是 9 个。各有 3 个和 5 个个体的狮子坝和钟灵种群等位基因数目也较少，都为 10 个。

所有出现的等位基因为 23 个，人工种群等位基因数目 20 个，比自然种群(19 个)略多。但是，以出现 5%以上的概率标准作为常见等位基因统计，人工种群出现 9 个常见等位基因，少于自然种群的 11 个，人工种群的平均常见等位基因为 10.25 个，也低于自然种群(11.0)。

3.3.4 等位基因丰富度

等位基因丰富度 A_R 基于最小种群黄水的 10 个个体计算而得，最高值是兴国种群的 1.960 和杉木种群的 1.917。自然种群平均等位基因丰富度为 1.702，高于人工种群的 1.670。

3.3.5 杂合度

观察杂合度 H_O 最高值也是兴国种群，为 0.2468，该种群的期望杂合度 H_E (0.1942)也最高。人工种群平均观察杂合度为 0.1648，而自然种群略小，为 0.1607。平均期望杂合度自然种群(0.1511)大于人工种群(0.1402)。

3.3.6 多态位点的固定指数

表 3.5 中列出了每个种群的多态位点固定指数 F_{IS} 。 F_{IS} 最大的是桂花种群，为 0.307。自然种群总固定指数为 -0.075，人工种群为 -0.130。经检验，所有种群的固定指数都符合哈一温平衡。

表 3.6 水杉 13 个种群的遗传多样性

Table 3.6 Measurements of microsatellite DNA genetic diversity in the 13 *M. glyptostroboides* populations

种群 Population	个体数 No. of samples	多态位点 百分比 P ₉₅ (%)	多态位点 百分比 P ₉₉ (%)	等位基因数 Number of alleles	常见等位基因数 Number of common alleles (P≥0.05)	平均等位基 因数 A	等位基因丰 富度 A _R	观察杂合度 H _O	期望杂合度 H _E	近交系数 F _{IS}
自然种群										
GH	27	57.14	57.14	13	11	1.857	1.679	0.0952	0.1340	0.307
XH	14	57.14	57.14	13	10	1.857	1.385	0.1633	0.1392	-0.137
SM	14	57.14	57.14	14	13	2.000	1.917	0.1837	0.1866	0.053
XG	11	57.14	57.14	14	10	2.000	1.960	0.2468	0.1942	-0.026
HS	10	57.14	57.14	11	11	1.857	1.571	0.1143	0.1014	-0.075
LT	3	28.57	28.57	9	9	1.286	-	0.0952	0.0794	0.000
SB	3	28.57	28.57	10	10	1.429	-	0.1429	0.1111	-0.091
MD	1	28.57	28.57	9	9	1.286	-	0.2857	0.1429	-
ZL	5	42.86	42.86	10	10	1.429	-	0.1714	0.1200	-0.333
平均	15.20	57.14	57.14	13	11	1.914	1.702	0.1607	0.1511	0.024
小计	88	57.14	57.14	19	12	2.714	1.884	0.1485	0.1558	-0.075
人工种群										
HZ	16	42.86	71.43	12	10	1.714	1.601	0.1607	0.1339	-0.169
NJ	17	28.57	57.14	11	9	1.571	1.454	0.1933	0.1352	-0.405
SH	15	42.86	57.14	13	12	1.857	1.776	0.1810	0.1606	-0.092
JH	23	28.57	71.43	17	10	2.429	1.850	0.1242	0.1310	0.074
平均	17.75	35.72	64.29	13.25	10.25	1.893	1.670	0.1648	0.1402	-0.148
小计	71	42.86	71.43	20	9	2.857	1.901	0.1610	0.1424	-0.130
总计	159	57.14	57.14	23	10	3.286	2.111	0.1545	0.1510	-0.040

3.3.7 基因分化系数

采用 Nei(1978)的基因分化系数(G_{ST})、各种群内的遗传多样性指数(H_s)、总遗传多样性指数(H_T)计算结果如下表。水杉自然种群种群内的遗传多样性指数 H_s 为 0.157, 总遗传多样性 H_T 为 0.159, 遗传分化系数 G_{ST} 为 0.015。遗传变异主要存在于种群内, 各种群间的遗传分化程度小。人工种群的 H_s 为 0.144, H_T 也为 0.145, 遗传分化系数 G_{ST} 只有 0.006, 人工各种群的遗传分化极小, 绝大部分遗传多样性来自于种群内部。

表 3.7 Nei's 基因分化系数

Table 3.7 Nei's gene differentiation coefficient

种群类型	种群内遗传多样性指数	总遗传多样性指数	遗传分化系数
Management type	H_s	H_T	G_{ST}
自然种群	0.157	0.159	0.015
人工种群	0.144	0.145	0.006
总计	0.151	0.154	0.022

用 Weir & Cockerham(1984)的 F-统计量计算种群的遗传分化结果(表 3.8)与上述 Nei(1978)法得到相似的结果。

表 3.8 Weir & Cockerham 的 F-统计量

Table 3.8 Weir & Cockerham's F-statistics

种群类型	种群内杂合基因多样性	种群间杂合基因多样性	总杂合基因多样性比率
Management type	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
自然种群	0.038	0.058	0.021
人工种群	-0.130	-0.121	0.008
总计	-0.040	-0.018	0.022

3.3.8 遗传一致度与遗传距离

遗传一致度和遗传距离的结果如表 3.9。不考虑谋道、狮子坝、洛塔和钟灵种群时, 所有种群遗传一致度最大的是杭州和黄水种群(0.9969), 最小为上海和兴国种群(0.9772)。自然种群的遗传一致度平均为 0.9902, 人工种群为 0.9947, 人工种群大于自然种群, 人工种群的遗传相似度比自然种群高。

遗传距离与遗传一致度是负相关的, 遗传距离最大的是兴国和上海种群(0.0230), 最小的是杭州和黄水种群(0.0031)。

3.3.9 聚类分析

下图是 UPGMA 对水杉种群的聚类结果。自然种群中重庆石柱县的黄水种群、利川的桂花种群和利川的小河种群聚合为一类。2 个人工种群分散在其中: 杭州种群聚在黄水种群

表 3.9 遗传一致度(上三角)和遗传距离(下三角)

Table 3.9 Nei's (1978) identity (upper diagonal) and distance (lower diagonal) values based on 7 microsatellite loci.

	HZ	NJ	SH	JH	GH	XH	SM	XG	HS	LT	SB	MD	ZL
HZ		0.9939	0.9945	0.9965	0.9965	0.9938	0.9876	0.9848	0.9969	0.9824	0.9828	0.9534	0.9675
NJ	0.0061		0.9949	0.9931	0.9884	0.9860	0.9889	0.9790	0.9874	0.9661	0.9688	0.9663	0.9556
SH	0.0055	0.0051		0.9950	0.9945	0.9874	0.9875	0.9772	0.9892	0.9778	0.9831	0.9684	0.9602
JH	0.0035	0.0070	0.0050		0.9966	0.9927	0.9902	0.9828	0.9953	0.9843	0.9817	0.9644	0.9688
GH	0.0035	0.0117	0.0055	0.0034		0.9932	0.9873	0.9825	0.9957	0.9866	0.9870	0.9642	0.9734
XH	0.0062	0.0141	0.0127	0.0073	0.0068		0.9913	0.9930	0.9958	0.9915	0.9886	0.9444	0.9884
SM	0.0125	0.0112	0.0125	0.0098	0.0128	0.0088		0.9903	0.9859	0.9777	0.9740	0.9654	0.9769
XG	0.0154	0.0212	0.0230	0.0173	0.0177	0.0070	0.0098		0.9871	0.9788	0.9719	0.9376	0.9840
HS	0.0031	0.0127	0.0109	0.0047	0.0043	0.0042	0.0142	0.0130		0.9895	0.9857	0.9441	0.9768
LT	0.0177	0.0345	0.0225	0.0158	0.0134	0.0085	0.0225	0.0214	0.0105		0.9958	0.9247	0.9867
SB	0.0173	0.0317	0.0170	0.0184	0.0131	0.0114	0.0263	0.0285	0.0144	0.0042		0.9274	0.9799
MD	0.0477	0.0343	0.0321	0.0363	0.0365	0.0572	0.0352	0.0644	0.0575	0.0783	0.0753		0.9211
ZL	0.0330	0.0454	0.0406	0.0317	0.0270	0.0117	0.0233	0.0162	0.0235	0.0134	0.0203	0.0822	

旁边，金华种群聚在桂花种群旁边。然后再与人工种群南京与上海形成的一类聚合。说明人工种群围绕在桂花、小河、黄水这一带周围。这些种群的聚类再与利川的杉木和兴国形成的一类聚在一起。自然种群湖北利川的狮子坝种群、湖南龙山的洛塔种群、利川的钟灵种群和谋道种群由于个体较少，都在最后与其它种群聚合。

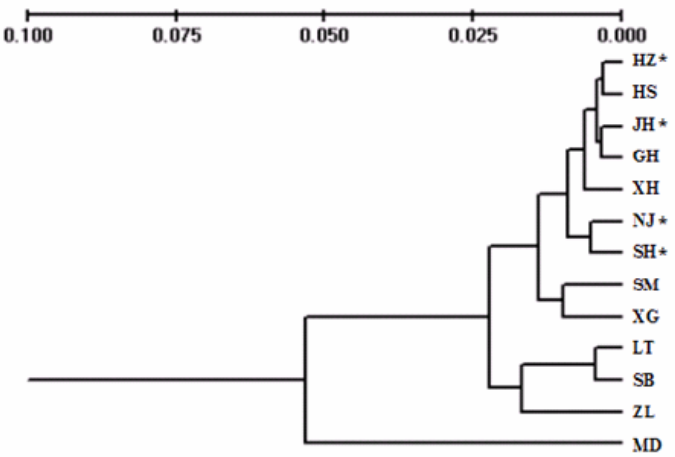


图 3.3 水杉种群的 UPGMA 聚类(带*的为人工种群)

Figure 3.3 UPGMA dendrogram of *M. glyptostroboides* populations

3.3.10 配比检验

4 个人工种群的配比检验，与自然种群个体的估算匹配情况如下表：南京种群的 17 个个体有 15 个估计来源于桂花种群的个体 GH27，1 个来自于黄水 HS10 个体，1 个来自于兴国 XG11 个体。上海种群的 15 个个体中 10 个来自于 GH27，1 个来自于 HS10，2 个来自于 XG11，2 个来自于杉木种群的个体 SM14。杭州种群的 16 个个体也是来自于桂花种群 GH27 的最多，达 14 个，另外 2 个来自黄水种群，也是 HS10 个体。金华种群共有 23 个个体，来源种群数目最丰富，其中 18 个来自于 GH27，另外 5 个分别来自 5 个种群的个体 HS10、XG11、SB03、LT03、XH14。各种群的来源百分比组成构图如图 3.4。

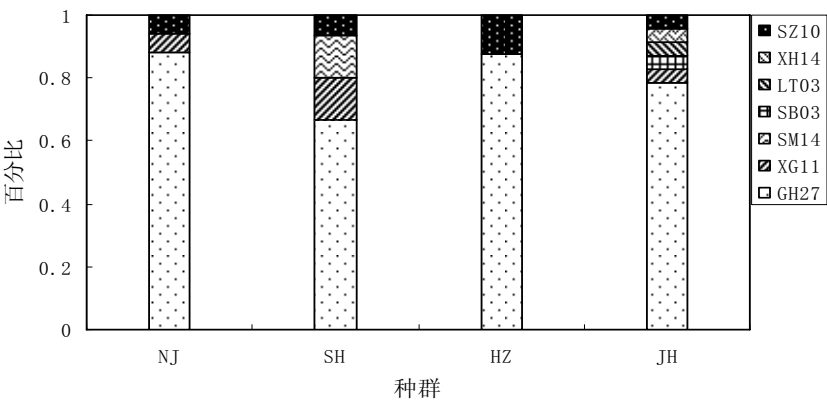


图 3.4 人工种群的配比检验

Table 3.4 Assignment tests for artificial populations

各个种群来源分配最多的都是利川桂花种群的 GH27 个体,并且在每个种群来源都占很大的比例。南京种群的 88.24%都是分配到此种群的个体。最小的比例上海也达到 66.67%,占三分之二。黄水种群的个体 HS10 在各人工种群中也都有分配。杭州种群的配比自然种群最少,只有桂花和黄水种群。南京也只有 3 个,多一个小河种群。上海除了桂花和黄水外,还有兴国种群也有匹配。分配最多的是金华种群,除桂花外,还在另 5 个种群中有匹配个体。

3.4 讨论

3.4.1 水杉自然种群的遗传结构

对水杉的预实验筛选 56 对日本柳杉的微卫星引物,只有 7 对能够应用于水杉分析中,另外 47 对引物大部分扩增无条带,可以看出,为某一物种设计的微卫星引物应用到同科其它物种中确实不如原物种合适,设计匹配保守序列的通用引物的方法对于微卫星来说很有困难(Zane *et al.* 2002)。另一方面预示着古老的水杉在进化中相当保守的特征,这在对水杉的其它学科研究中都有较强的体现,如水杉发现之初胡先骕和郑万钧(1948)从它的叶、孢子叶及种鳞等交互对生特征认为足以把水杉提升为水杉科,李林初(1989,1990)从细胞的核型角度发现与同科其它植物有较大差异。

本研究用 SSRs 研究水杉自然种群 88 个个体得到 57.14%的多态位点百分比,低于用 RAPD 方法对自然种群相近样本数(81 个)的研究结果(87.93%)(Li *et al.* 2005),与李春香等(1999)用 RAPD 方法对水杉自然种群 27 个个体的多态性条带比率 53%相近,高于李晓东等(2003)用 RAPD 方法对水杉 48 个个体遗传多样性分析所得的多态位点百分比(10.53-33.33%)。除了方法上 SSR 较 RAPD 不随机性的差异和取样数量的差异外,水杉的微卫星变异率属较低的。水杉自然种群的多态位点百分比低于挪威云杉(*Picea abies*)66%的比例(53 个 SSRs 位点中 35 个是多态位点)(Scotti *et al.* 2002)等。

水杉 9 个自然种群 88 个个体在 7 个微卫星位点共有等位基因 19 个,平均每位点 2.71 个等位基因,小于这些位点应用于日本柳杉中的等位基因数量(平均 6.78 个等位基因)(Moriguchi *et al.* 2003, Tani *et al.* 2004)。水杉自然种群的每位点的平均等位基因数目远远低于其它裸子植物物种平均每位点的数目,如黄杉(*Pseudotsuga menziesii*)102 个个体 50 个微卫星位点的平均每位点等位基因数为 7.5 个(Amarasinhe & Carson 2002),白云杉(*Picea glauca*)32 个个体在 6 个位点上平均等位基因 14.5 个(Rajora *et al.* 2001),美国黑松(*Pinus contorta* var 'latifolia')30 个个体平均每位点 21.0 个等位基因(Thomas *et al.* 1999),被子植物的微卫星位点等位基因数目也高于水杉自然种群,如真桦(*Betula maximowicziana*)54 个个体 11 个位点的平均每位点有 3.0 个等位基因(Goto *et al.* 2004),牛油树脂(*Vitellaria paradoxa*)441 个个体 10 个位点的 4.3 个等位基因(Kelly *et al.* 2004),茜草科毛茛属 *Antirhea borbonica* 植物 366 个个体的 7 个位点有 7.14 个等位基因(Litrico *et al.* 2005),浙尖栲(*Castanopsis acuminatissima*)72 个个体 5 个位点的 10.8 个等位基因(Blakesley *et al.* 2004),尖叶栲(*Castanopsis cuspidate*)32 个个体 7 个位点的 13.9 个等位基因(Ueno *et al.* 2000),印加豆(*Inga edulis*)189 个个体 5 个位点的 15.0 个等位基因(Hollingsworth *et al.* 2005)。

我们得出的水杉自然种群的种内遗传多样性指数(H_s)0.157 的结果,也小于以前用 RAPD 方法得到的遗传多样性值(0.2341) (Li *et al.* 2005),低于 *Polaskia chichipe* 种群的

$H_S=0.646$ (Otero-Arnaiz *et al.* 2005)。水杉自然种群间遗传多样性 $H_T=0.159$ ，远远低于赤松(*Pinus resinosa*)159 个个体 9 个微卫星位点的遗传多样性($H_T=0.618$)(Echt *et al.* 1998)以及 *Polaskia chichipe* 种群的 0.658(Otero-Arnaiz *et al.* 2005)。水杉自然种群较低的遗传多样性，李晓东等(2005)和 Li 等(2005)都有同样结论。冰期和人为活动两方面原因降低了水杉自然种群的遗传多样性(Li *et al.* 2005)。

水杉自然种群遗传分化程度 $G_{ST}=0.015$ ，远小于 RAPD 方法得出的 $G_{ST}=0.2442$ (Li *et al.* 2005)，低于赤松(*Pinus resinosa*)的 $G_{ST}=0.121$ (Echt *et al.* 1998)。同样水杉自然种群的 $F_{ST}=0.021$ 低于青栲(*Cyclobalanopsis myrsinaefolia*)自然种群的 SSRs 位点估算的 $F_{ST}=0.044$ (Liu *et al.* submitted)以及牛油树脂(*Vitellaria paradoxa*)自然种群 10 个 SSRs 位点的 0.026 (Kelly *et al.* 2004)，但其它植物也有一些遗传分化程度低的报道，如 *Polaskia chichipe* 种群的 $F_{ST}=0.015$ (Otero-Arnaiz *et al.* 2005)，*Lychnis flos-cuculi* 种群的 0.022 (Galeuchet *et al.* 2005)，真桦(*Betula maximowicziana*)的 F_{ST} 为 0.0028 至 0.0158 之间(Goto *et al.* 2004)等。

3.4.2 水杉人工种群和自然种群遗传结构比较

水杉人工种群 95%标准下的平均多态位点百分比为 35.72%低于自然种群(57.14%)，与其它对水杉的研究结果相似(Kuser 1997, 李晓东等 2005, 史全芬等 2005, Li *et al.* 2005)。人工种群遗传多样性比自然种群低的现象在其它物种中也有报道，如挪威云杉(*Picea abies*)(Gomory 1992)、白云杉(*Picea glauca*)(Rajora 1999)、银杏(*Ginkgo biloba*)(Fan *et al.* 2004)、大叶藻(*Zostera marina*)(Williams & Davis 1996)、梧桐科植物 *Scaphium macropodum* (Ratnam *et al.* 2000)、印加豆(*Inga edulis*)(Hollingsworth *et al.* 2005)等。人工种群的遗传多样性低与恢复方法有关，比如取样效应和小种群效应都会导致恢复种群的遗传多样性降低(陈小勇 2000)。另外，水杉引种过程还存在无性繁殖，也使人工种群丢失部分遗传多样性。据报道，自 1979 年来，利川约 1.6 亿棵扦插水杉苗运往外地(文甲举等 2001)。

人工种群的平均等位基因数目(13.25)略多于自然种群(13)，但平均常见等位基因数目(10.25)却少于自然种群(11)。说明水杉人工种群有特有等位基因出现，但频率又不大，这种结果的出现有两方面可能的原因：一是引种的个体含有这些等位基因，但我们研究中的样本未包含这些个体；二是人工种群作为自然种群后代，有一部分基因流是由花粉贡献的，因此后代可能比母本等位基因丰富(Morris *et al.* 2002)。在青栲的研究中也出现了这种有趣的现象(Liu *et al.* submitted)。

水杉人工种群的平均观察杂合度 $H_O=0.1648$ ，高于自然种群(0.1607)，但平均期望杂合度($H_E=0.1402$)低于自然种群(0.1511)。可能是由于人工种群存在适合度低的一些纯合基因型，在个体生长早期阶段已被淘汰，在数值中未能体现这些降低观察杂合度的因素，因此人工种群观察杂合度偏高，而期望杂合度略低于自然种群。

人工种群的基因分化系数 $G_{ST}=0.006$ 小于自然种群的 $G_{ST}=0.015$ ，说明人工种群的遗传分化程度非常低，他们之间有着比自然种群更加相似的遗传结构，其它对水杉的研究也得出同样结论(李晓东等 2005, Li *et al.* 2005)。青栲(Liu *et al.* submitted)、大须芒草(*Andropogon gerardii*)和印第安草(*Sorghastrum nutans*)(Gustafson *et al.* 2004)的研究都有类似结果。

3.4.3 水杉人工种群的种源

人工种群出现了某些稀有等位基因,反映种源来自于某些特定的“优树”的可能性较大。聚类分析中人工种群都围绕在黄水、桂花和小河种群间,个体与个体之间的配对检验也表明,人工个体大部分来自桂花种群的一个个体,说明人工种群的种源大多出自桂花、小河种群。小河是水杉较集中的分布地带,水杉管理站位于此地,小河和桂花两个村落离的很近,黄水也和小河只有一山之隔,并且黄水的水杉有可能是小河引种的(Li *et al.* 2005),推测可能这一带的水杉种子输出较多。我们收取来自利川的种子中,出自桂花种群的种子占了总数的一半之多,都表明人工种群种源单一的现象。非随机取样导致水杉后代种群偏离原生种群(Li *et al.* 2005),这种现象在松树(*Pinus coulteri*)(Ledig 2000)、挪威云杉(*Picea abies*)(Gugerli *et al.* 2001)等新建种群中都有报道。传统收集水杉种子的方法是采用一些长势良好或容易采集的母树的种子,偏远地方的种子一般由于交通不便也不易被收集到。这样就使种子缺乏广泛的代表性(Helenurm & Parsons 1997),人工水杉种群种源来源单一。上海市不同时代引种的水杉种群遗传结构相似也说明种源来源单一的现象(Chen *et al.* 2003)。种源单一造成引种的树木丧失了水杉基因库中的部分基因,遗传变异程度降低。

另一方面,人工种群间的遗传分化小于自然种群间遗传分化,人工种群有更加相似的遗传结构,表明人工种群的种子或种苗来源一致。考虑到种子往往从多个自然种群中收集的,说明来自不同种群的种子在当地即混合,然后发往各地种植。该结果与其它研究中一致(史全芬等 2005, Li *et al.* 2005),都说明人工种群中存在种质混杂现象,尽管种质混杂可以提高种群内的多样性,但引起了人工种群的高度相似性,还可能导致远交衰退(Barrett & Kohn 1991, Waser 1993)。

第四章 水杉的种子形成及幼苗生长

4.1 前言

繁殖是进化过程的核心，也是研究任何生物进化问题的关键，因此植物种群生物学家必须重视他们所研究对象的繁育系统(breeding system)(张大勇 2004)。了解植物的繁殖生物学有助于探究植物种群的自我更新能力。

4.1.1 植物的交配系统与近交衰退

4.1.1.1 繁殖方式和交配系统

植物的繁殖包括无性繁殖(asexual reproduction)和有性繁殖(sexual reproduction)。广义的无性繁殖包括两大类：营养繁殖(vegetative reproduction)和无融合生殖(apomixis)，或称无配生殖(agamospermy)。有性繁殖是高等植物主要的生殖方式，它的生物学意义在于通过减数分裂形成配子和通过受精实现遗传重组(陈小勇 2004)。有性繁殖的两个最重要特征是：(1)通过配子体的有性融合、染色体分离、等位基因重组等产生了遗传变异；(2)允许基因迁移，从而使成功突变能在世代之间、种群之间及种群内部运动、扩散(张大勇 2004)。高等植物的进化就依赖于有性繁殖中非常短的配子体阶段(gametophytic phase) (Boavida *et al.* 2005)，因此有性繁殖可以为植物提供进化潜能——当环境条件变化时，有性繁殖可以使植物更加容易适应新环境。在二倍体和多倍体生物中，各个能相互交配的个体所携带的遗传信息通过有性繁殖汇聚于一个种群中(陈小勇 2004)。

交配系统是生物有机体通过有性繁殖将基因从一代传递到下一代的模式，包括控制配子结合以及形成合子的所有属性(转引自陈小勇 2004)。测定植物的交配系统不仅可以了解物种的繁殖格局，交配系统在确定植物种群的遗传组成、遗传结构以及基因流等方面都有重要作用(陈小勇等 1997, 2001)，对种群间遗传分化的作用十分大(张大勇等 2001，何田华等 2001)。植物交配系统的研究可以分为两个层次(何田华等 2001)：第一个是研究自交与异交所产生子代的相对比例，即种群的自交率与异交率。这是植物种群交配系统最重要的参数，它是植物交配系统的集中反应(陈小勇 2004)。第二个层次是植物基因流的过程与式样，这也与保护生物学密切相关。

植物种群结构也会影响交配系统，不同大小的种群的遗传格局存在差异，从而影响到交配系统，尤其是近交的影响较大；种群密度也与异交率存在相关性，自交亲和的物种中，自交率一般随种群密度增加而下降，自交不亲和物种中往往相反。另外，一些环境因素如气候气象因子、地理地形因子等也会影响植物种群的交配系统(陈小勇 2004)。植物的克隆繁殖也会影响自交率，如由于矮慈姑同株之不同克隆分株间交配的频繁发生，导致其自交率较大(汪小凡，陈家宽 1999)。另外，传粉者的适应性和活动能力也对交配系统产生影响(葛菁萍，林鹏 2001)。

4.1.1.2 研究交配系统的方法

因为花粉粒太小，存活时间短，很难观察到单个的交配事件，或直接决定单个雄性配子的基因型，因此植物交配系统的研究必须从母本个体和它们子代的遗传数据来推测交配事件(何田华等 2001)。自20世纪60年代中期等位酶技术应用于种群遗传分析后，植物交配系统

的研究得到快速发展(陈小勇 2004), 后来一些新的分子标记如SSR、RAPD、AFLP等也得到了广泛的应用(Parker *et al.* 1998)。研究交配系统的方法大致有下列几种(陈小勇 2004):

(1)混交估测模型

Clegg(1980)提出了根据后代基因型推断交配系统参数的具两个等位基因的单位点混交模型。这个模型基于四个基本假设:(1)所有子代都是随机异交(异交率为 t)或自交(自交率 $s=1-t$)形成的;(2)所有母株接触的花粉库基因频率相同;(3)异交率与母株的基因型无关;(4)在交配和子代基因型调查中不存在选择作用。在这些假设条件下, 可以精确计算后代各基因型的比例。

单个位点异交率估测模型存在一些问题, 比如对异交为主的植物种群, 估测的异交率经常大于1, 不同位点估测的结果也存在较大差异等等。鉴于以上问题, Ritland和Jain(1981)基于单个位点模型导出了多个独立位点异交率估测模型, 多位点异交率模型估测的结果受选择和非随机交配影响较小。Show等(1981)从检测概率入手, 也导出了一种多位点异交率估测模型。Ritland还编写了一个免费的交配系统计算程序MLT(Ritland 1990), 后经过完善成MLTR程序(Ritland 2002)。

(2)亲本分析法

混交模型基于4个假设实行, 但自然种群如果不符合假设时这种方法就不能很好的解决问题。亲本分析可以从另外一个角度对交配系统估测, 它主要是通过观察和采用遗传标记构建种群谱系。自然种群中主要分析种子和幼苗, 目的是判定种子和幼苗是由哪个成体自交或由哪两个成体异交产生的, 确定后可以直接计算异交率。自然种群中, 分析种子的母本比较简单, 故亲本分析主要是父系分析。而对于自然定居的幼苗来说, 亲本分析相对复杂一些, 但方法基本上与父系分析一致。亲本分析的方法主要有遗传排除法(genetic exclusion)、最大似然分配法(maximum likelihood assignment)和父性拆分法(fractional paternity assignment)3种。不同方法各有利弊, 在存在较多的多态位点且等位基因频率分布适中的小种群中, 采用遗传排除法的结果最可靠; 而在较大的种群中, 分析目的若是采用后代的贡献率来测定适合度时, 采用父性拆分法误差较小。因此, 研究中具体采用什么方法, 要根据研究的物种和研究目的而定(陈小勇 2004)。

4.1.1.3 近交、远交及其衰退

(1)近交与近交衰退

近交包括植物的自交和亲缘个体之间的异交, 近交将降低近交后代的相对适合度, 称为近交衰退。自然植物种群中近交衰退程度通过比较自交和异交后代的相对适合度来衡量, $\delta = 1 - w_s / w_o$, 其中 w_s 和 w_o 分别为自交和异交后代的适合度。理论模型预测, 随自交率的增加, 近交衰退的程度将会降低, 因为有害隐性等位基因表达出来并被自然选择清除(张大勇 2004)。

关于近交衰退陈小勇(2004)总结为以下结论: (1)当经历一定的环境胁迫时, 近交导致的近交衰退效应更明显。环境条件优越时表现为中性或轻微不利的性状, 在恶劣的胁迫环境中却可能变成有害的。Hayes等(2005)利用氮肥的有无对葫芦科的一种瓜 *Cucurbita pepo* 进行种植研究, 结果是未施氮肥的瓜近交衰退现象比施肥的严重。(2)近交衰退在生活史较后阶段比早期阶段更明显(Husband & Schemske 1996)。Weller等(2005)对石竹科一种高度自交植物

*Schiedea viscosa*研究表明, 其早期生活史阶段(包括每孢蒴种子数、种子大小和发芽)没有近交衰退, 晚期的生活史阶段结实的时候有近交衰退现象。Hayes等(2005)实验证明, 对*Cucurbita pepo*进行4年的种植中近交衰退数值从0.16变化到0.53, 并且每年都在变, 他们认为对近交衰退的估计只代表了动态环境中一组经常变动的可估计值中的一个单一点值。但情况也不完全是这样, Andersson和Waldmann(2002)对川续断科蓝盆花属植物*Scabiosa canescens*研究时认为在其生活史早期和后期阶段, 近交衰退没有明显差异。(3)近交衰退的变化幅度很大。不同种群近交衰退程度不同, 异交率低的种类近交衰退相对较低, 但也有特殊情况。(4)近交衰退在经历不同近交史的家系中会有所不同。

一般认为导致近交衰退有两个主要机制: (1)有害隐性或部分隐性等位基因固定, 形成纯合子, 而在杂合状态被显性等位基因所掩盖(Dudash & Carr 1998, Glémin *et al.* 2001); (2)等位基因可能存在超显性, 两个纯合子的适合度低于杂合子的。这两种近交衰退的机制在经历近交种群的长期效应是不同的。由有害等位基因引起的近交衰退可以因选择作用而清除, 而超显性引起的近交衰退除非降低种群的平均适合度, 否则不会被消除(Dudash & Carr 1998)。

(2)远交与远交衰退

相距很远的两个个体之间交配有可能也降低相对适合度, 这种空间距离较大个体间的交配比相对较近个体间交配的适合度低的现象, 称为远交衰退。

导致远交衰退现象有两种主要机制(Galloway & Fenster 2000): 一种和局部适应性(local adaptation)有关。生态上趋异的两个种群杂交会导致个体表现为中间类型的基因型, 而这种基因型在两个地域都不适应。种群内不适应的个体比例增加, 导致种群生存能力降低。另一种机制是远交衰退将打破位点间的联系, 确切地说, 打破了不同位点的等位基因间的连锁不平衡现象(Fenster *et al.* 1997)。因为特定等位基因的表现形式往往依赖于其它位点的等位基因。几个位点通过染色体相互作用共同产生功能性的显性性状, 即共适应性基因复合体(coadapted gene complexes)。杂交使共适应性基因复合体分离而有可能导致远交衰退。不管什么机制, 远交衰退反映了部分交配障碍。这种障碍发生在合子形成之后, 因为远交衰退是指后代的行为, 然而在某些情况下, 中等尺度上合子形成后的障碍可能通过花粉在繁殖成功率方面的差异而得到加强(陈小勇 2004)。

4.1.2 植物的种子形成及幼苗生长

种子是种子植物在完成开花、传粉和受精等一系列过程以后产生的, 种子是植物个体最初的浓缩, 是植物个体生长的基础, 因此种子的质量决定着个体的强弱兴衰。植物种群的密度影响产种子的质量, 密度增大时种子质量降低, 种子的千粒重也降低(Rahman *et al.* 2005)。植物的交配系统也影响种子质量, 赖焕林和王明庥(1997)研究了马尾松种群的交配系统, 认为马尾松林的异交率低影响了后代种子的质量。

种子质量对植物适合度影响较大。这在 Orellana 等(2005)的实验中得到证实, 如果种子重量大, 它的发芽时间可能较早, 并且发芽率也较高。生境片段化势必降低植物的适合度, 因为它减少了植物的种子数量(Aizen & Feinsinger 1994)。由于小种群导致种群遗传变异的丧失以及近交衰退的发生(陈小勇 2000b), 所以片段化也可能通过影响种子质量而降低植物的

适合度，比如种子生存力、大小和发芽。Henriquez(2004)报道了生境片断化对智利国花喇叭其藤(*Lapageria rosea*)种子质量的影响。他对采自智利中部 Maulino 森林的片断化生境和连续生境的该植物种子的生存力、大小和发芽能力进行比较。片断生境和连续生境的种子具有相似的生存力，但是片断森林中的种子小于连续森林的，发芽能力也低于连续森林。并且他认为，片断化生境中种子质量低会对幼苗生长和种群长期存活产生负作用。Henriouez(2004)从种子生存力、种子大小和种子发芽率三方面检验了片断化环境对吊钟花(*Lapageria rosea*)的种子质量的影响，结果也表明片断化影响种子质量进而影响植物后代的适合度。

种子发芽是植物发育过程承上启下的阶段，它直接表达了亲本产生种子的质量，又是后代幼苗生长的第一步，是植物亲代繁殖情况与子代生长情况的重要指示阶段。种子发芽的早与晚会对植物的适合度有影响。Verdu 和 Traveset(2005)研究证明，植物早期的发芽时间差异影响植物各个组成的适合度，比如早发芽对幼苗存活没有影响，但对幼苗的生长和繁殖能力却大有好处。不过这种实验效果与种子大小或生活型等这些遗传因素有关，同时也与实验的方法有关，比如调查时间以及实验条件等等。Verdu 和 Traveset(2005)认为多年生植物比一年生植物能够从早发芽中获得更多好处，因为多次繁殖可以使之在每年最适合的条件下发芽。而对于一年生植物，因其只有一次出苗机会，发芽扩大了它生存风险。Verdu 和 Traveset(2005)还对人工控制和田间两种条件下，发芽时间和幼苗生长的关系做了研究。结论是它们相关的程度有所不同，人工控制条件下关系更紧密一些，可能因为人工控制条件下植物能得到充足的营养和水分。单个果实里包含的种子数量会影响种子发芽时间以及幼苗的适合度。Khan 等(1999)对铁力木(*Mesua ferrea*)的实验发现，铁力木的一个果实一般含 1-4 粒种子，这 4 个梯度的种子重量是递减的，种植时，种子发芽时间也是递减的，但种子发芽率却沿梯度上升。他们证实每果实只产生一粒种子的幼苗比产生多个种子的幼苗生长的强壮。

近来对植物适合度的分子机制也有些探讨，其中围绕拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)展开的研究较多，如 Malmberg 等(2005)讨论了与适合度相关的控制数量性状基因的上位效应在拟南芥的结果实数量、发芽及种子长宽方面的作用。Roux 等(2005)、Luo 等(1999)以及 Alonso-Blanco 等(1999)也在这方面做了一些工作。Giroux 等(1996)报道了在玉米(*Zea mays*)中发现了一个能够提高种子重量的基因，他们希望能够提高农作物的产量。

在植物繁殖过程要经历一系列阶段，众多因素都会对繁殖的成功产生影响，各种影响因素的作用强度各不相同，找出其中影响作用最大的因素是清除植物繁殖障碍的关键。Pinder 等(1995)就对火炬松做了这方面的工作。火炬松的繁殖成功率不高有多种可能的影响因素：(1)由于个体隔离出现花粉不充足现象，导致有活力的种子产量低；(2)种子被取食；(3)缺乏种子发芽合适的生境；(4)植物间的他感作用对发芽的抑制；(5)放牧和其它动物的破坏；(6)后代死亡；(7)竞争和他感效应影响菌根的相互作用对生长的抑制；(8)干旱对幼苗生长的抑制。Pinder 等(1995)通过对种子产生、形成幼苗概率和幼苗存活及生长的研究，发现影响火炬松繁殖成功的主要因素是种子形成幼苗的概率非常低。

4.1.3 水杉的繁殖生物学特性

水杉在我国发现引起我国及世界众多科学家的关注，对水杉发育繁殖特性的研究也如火如荼。水杉单性花，雌雄同株，异花授粉。每雌花有珠鳞多数，每珠鳞具胚珠 5-9 枚，雄

花成总状或复总状花序，长 15-30cm，生于一年生枝顶并作穗状下垂，雌花芽略大于叶芽，并多呈四棱形，越冬的雌雄花芽均包被于苞鳞之中，外观色泽与叶芽枝色一致(张卜阳 2000)。

水杉发育迟缓，开始结实的年龄较大，比一般杉、松树结实年龄晚得多，同一棵树的雌球花先于雄球花成熟。一般，水杉树长到 20 年能产生雌球花，25 年左右才产生雄花序(张卜阳 2000)。但水杉保持结实的年限很长，原产地数百年的古树仍有结实能力。

张卜阳等水杉原产地的一批工作者根据长期观察经验，报道了原产地水杉开花结实的全过程(张卜阳，张丰云 1980，张卜阳 2000)。为了清楚起见，我们将水杉雌雄花的形成过程整理成下表(表 4.1)。

表 4.1 水杉雌雄花形成及开花过程(根据张卜阳和张丰云(1980)整理)

Table 4.1 The female and male flower development and flowering process of *M. glyptostrobooides* (summarized from Zhang & Zhang(1980))

发育期 Developmental stage	日期 Time	雄 花 序 Male inflorescence	雌 花 芽 Female flower bud
花芽分化期	5 月下旬	雌雄花还未长出，只有叶芽	
	6 月中旬	新梢上开始出现雄花序	
	6 月下旬	雄花序长 4-6 厘米，有雄花芽 3-5 对(南林和华农是 7 月)；雄花芽着生方式一般是对生，也有双个对生、三个轮生、单个互生；雄花序的花枝一般为 3 个以上的分枝，也有单枝出现	
花芽形成期	7 月下旬	雌花芽出现	
	8 月上旬	雄花芽显著增大，长 2mm，宽 1.6mm	雌花芽增大，四棱，顶端尖，长 3mm，宽 2.5mm
	8~9 月	雄花序逐步形成，雄花芽对生或 3 个轮生，贴生在花轴上	雌花芽逐步形成，雌花芽单生或对生，着生在结果枝上，成散生状
花芽成熟期	10 月下旬	雄花序长 16-22cm，一般有 3-4 个分枝，复总状花序，成穗状下垂于枝端；雄球花芽的花粉粒已接近成熟	雌球花芽长大，成四棱状长椭圆形，长 5mm，粗 2.5mm 左右，芽鳞呈黄褐色
	11 月下旬	雌雄花芽都为交互对生的芽鳞所包被，形成棕黄色冬芽，呈休眠状态	
	休眠		
开花、传粉	2 月下旬至	雄球花开放，芽鳞张开，露出雄蕊，花粉囊开裂，散发花粉	雌球花相继开放，芽鳞张开，露出珠鳞，接受花粉(传粉期持续 10d 左右)
	3 月上旬		

下表是水杉种子的发育过程和球果的形成过程(表 4.2)

表 4.2 水杉种子和球果的发育(根据张卜阳和张丰云(1980)整理)

Table 4.2 The seed and cone development of <i>M. glyptostrobooides</i> (summarized from Zhang & Zhang(1980))				
日期	雄配子体	雌配子体	胚	球果
Time	Male gametophyte	Female gametophyte	Embryo	Cone
3 月上旬至 4 月下旬		花粉粒在珠心上停留 月余后逐渐萌发，形 成花粉管进入珠心组 织		雌球花授粉后不 断增长成为幼 果，具 4 行交互 对生的珠鳞
5 月上旬		胚珠内母细胞发育成 雌配子体，大孢子萌 发，进入游离核时期		
6 月上旬	精原细胞发育为雄配 子体，花粉管深入珠心	雌配子体进入蜂窝状 生长期，细胞壁形成		球果迅速增长， 幼果果径达
6 月下旬	花粉管接近大孢子壁， 精子逐渐形成	雌配子体颈卵器发育	精原细胞进入颈卵器 同卵细胞结合，完成受 精作用，原胚发育	1.5cm 左右
7 月			胚细胞不断分裂和分 化，形成具有子叶、胚	
8 月			芽、胚根的种胚	幼果缓慢增长，
9 月			种胚发育成熟充满胚 乳，种皮形成两侧发育 成膜翅，种子逐渐成熟	并长成 2cm 长的 果柄
10 月				球果发育成型， 为四棱形椭圆 形，果径达 1.8 ×1.6cm，果鳞逐 渐木质化，球果 转为黄褐色，进 入成熟期

水杉胚胎的发育早在 1964 年就被我国老一代科学工作者王伏雄、钱南芬(1964)进行了细致的研究。他们指出，从胚胎发育角度来看，水杉具有一系列杉科共同的特征：(1)颈卵器集合成为复合颈卵器；(2)复沟核存在；(3)花粉粒具有一个乳头状突起；(4)2 个精子相等；(5)原胚结构基本上与大多数杉科各属一致；(6)裂生多胚现象经常产生，并认为水杉属应保持在杉科一个单种属的位置。

张卜阳(2000)对原产地水杉生长量的资料分析,总结了自然水杉在各个生长发育阶段的不同生长水平:

- 11-35 年 壮龄时期,是水杉的速生阶段,树高生长旺盛,年平均生长量在 70cm 以上,胸径年平均生长达 1cm 多;
- 20-60 年 进入干材增长阶段直径生长加快,年平均生长量达 1.2cm 左右,林木材积迅速增长,经济效益显著提高;
- 40-80 年 生长成熟阶段,生长速度虽有所下降,但高年平均生长量仍 50cm 左右,直径生长每年保持 1cm 左右。材质明显变化,心材比例增加,材质变坚实;
- 80 年后 过熟阶段,进入老龄时期,生长趋于缓慢,高年生长量下降到 40cm 以下,直径生长年平均在 0.7cm 左右,但生长发育未衰。

水杉可以有性繁殖,也可无性繁殖。自水杉发现后,原产地就成为种源输出地,为国内及世界各地提供种子。湖北省利川市小河村是水杉种子的主要产地,方圆 800km²范围内的 5426 棵水杉母树供应了全国 90%以上的水杉种子,种子年产量形成了“丰—平—歉—歉”的周期过程(王希群 1994)。据多年经验,树冠阳面的壮龄母树采的种子质量较高,初结实的母树种子质量较低。水杉种粒小,含胚乳少,有效胚低,发芽率不高,所以一般不容易成苗。一些学者对水杉种子的发芽条件有过探索,如廖绍忠和周万良(1989)、辛霞等(2004)。我国许多一线工作者同样对水杉的室外育种积累了大量经验。王定胜(2002)报道他们采取“温床播种,芽苗移栽”的综合技术路线对水杉进行室外播种经验,能够使水杉种子发芽早出苗快、产苗量高、长势好。

水杉的无性繁殖是用幼枝扦插育苗,已成为我国各地育苗的另一主要途径,积累了许多成功的经验。水杉的扦插育苗一般是分为春季硬枝扦插和夏季嫩枝扦插(张卜阳 2000,王定胜 2002)。对水杉推行无性系选种是快速而高效的途径,选择母株个体的优良与无性系生长状况关系密切(马常耕,程长元 1992)。利用水杉造林时,环境因素中土壤的质地是最关键的指标,堆积土、砂壤土对造林有利(虞沐奎 1994)。生产上,水杉无性繁殖常用露地扦插的方法,但存在成活率低,苗期管理成本较高,苗木质量一般,当年出苗率低等问题。王鸣凤等(2002)报道采用地膜覆盖扦插育苗,能较好的解决上述问题,可以显著提高苗木质量。

我国老一辈科学家和原产地利川县多年经验的工作者们对水杉自然种群的繁殖生物学开展了很多研究,但是人工水杉种群的自我更新能力如何?限制人工水杉的繁殖成功最主要的因素是什么?此方面研究未有报道。本章从植物繁殖过程中交配系统、种子形成和幼苗生长等方面把人工水杉种群与自然种群做一比较,探讨人工种群的自我更新能力。

4.2 材料与方法

华东师范大学位于上海市市中心区西面(图 4.1),北面金沙江路段长约 830m,西面枣阳路段长约 1260m,东面中山北路段长约 1000m,南面苏州河段长约 850m,四条路内包围的地方就是我们的研究地,面积约为 937,900m²,其中华东师范大学占地面积 714,824 m²。

为了便于详细的调查水杉人工种群的生长、繁殖情况,选取了我们周围——上海华东师范大学及附近的水杉栽培种群作为代表种群研究。另外,还选取了第一批水杉引种地并且现今长势较好的黄山汤口镇水杉种群做了一般调查。

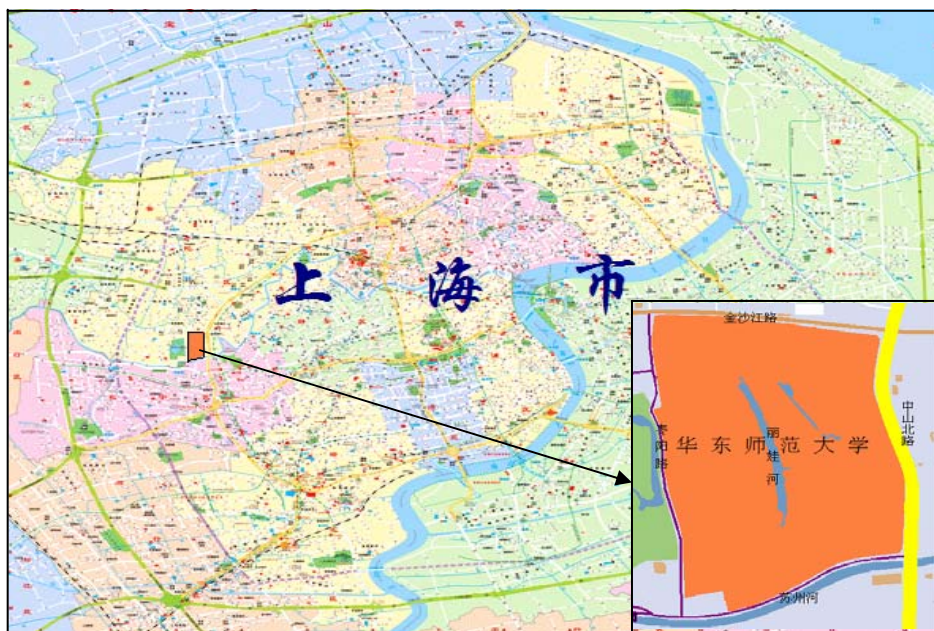


图 4.1 水杉人工种群研究地点和范围

Figure 4.1 The location of an artificial *M. glyptostroboides* population in East China Normal University (ECNU)

4.2.1 人工种群水杉个体的分布与年龄结构调查

为了更好的了解华东师大水杉种群的情况，我们对水杉的个体分布做了调查。于 2004 年 2 月 16 日至 20 日间对华东师大水杉种群进行所有个体的定位调查，范围从东面华东师大正门中山北路起，西至华东师大后门枣阳路，南起华东师大校园外的苏州河，北至金沙江路所覆盖的地方。

因为是人工种植种群，所以地段内水杉个体分布较为集中，各个小种群的界限明显，小种群内个体排列整齐。因此，我们将研究地点分为 15 部分，编号分别为 A-O 区(表 4.3)。定位同时统计每个分区内水杉的个体数，并且对 4 个水杉林(E、G、H、M 区)进行面积测量，计算水杉林中个体密度。

表 4.3 华东师大种群 15 个分区

Table 4.3 The 15 districts of the study in ECNU

区域 Subarea	地点 Site
A 区	长风一村
B 区	环境科学系和网球场
C 区	河西食堂周围
D 区	游泳池周围
E 区	老图书馆周围
F 区	化学系东面一带

G 区	办公楼西面一带
H 区	地理馆周围
I 区	丽娃河南段的两侧，从数学馆、科学会堂到研究生宿舍楼一带
J 区	文科大楼前
K 区	幼儿园周围
L 区	师大一村
M 区	工会附近
N 区	校外枣阳路南段
O 区	原师大二附中内外

另外还于 2004 年 11 月测量华东师大所有水杉个体的胸高周长,换算成胸径(the diameter at breast height, DBH)。从 0 开始按胸径大小每 5cm 为一等级分级，每等级的胸径范围见表 4.4。

表 4.4 胸径大小及年龄等级划分

Table 4.4 The size-class of DBH of *M. glyptostroboides* populations

胸径等级	胸径大小(cm)	胸径等级	胸径大小(cm)	胸径等级	胸径大小(cm)
Size-class	DBH	Size-class	DBH	Size-class	DBH
1	0-5	13	60-65	25	120-125
2	5-10	14	65-70	26	125-130
3	10-15	15	70-75	27	130-135
4	15-20	16	75-80	28	135-140
5	20-25	17	80-85	29	140-145
6	25-30	18	85-90	30	145-150
7	30-35	19	90-95	31	150-155
8	35-40	20	95-100	32	155-160
9	40-45	21	100-105	33	160-165
10	45-50	22	105-110	34	165-170
11	50-55	23	110-115	35	170-175
12	55-60	24	115-120	36	175-180

4.2.2 花的发育与结实情况调查

分别于 2004 年 2 月、2004 年 11 月和 2006 年 3 月三次调查了华东师大所有水杉花的发育情况。这时水杉当年的雄花序已经发育成熟，处于进入休眠或者即将结束休眠的时期，这一时期较长，一般持续到来年春天传粉授精，然后再长成次年的果实。雄花复总状花序一般长 20cm 左右，长在枝顶，一般容易辨别。并对雄球花进行解剖观察。水杉的雌花芽单个着生在枝上，约为 5mm 长，2.5mm 粗，用高倍望远镜也难以观测到。因此只记录了雄花序的分布个体。计算每个小种群具有雄花序的个体数目和比例。

三次调查同时还进行球果的生长观测，记录当年具球果的个体分布。计算每个小种群具有球果的个体数目及比例。

因为当年的球果是当年的花春天传粉授精，冬天才形成的球果，所以调查期间果实都是上年调查的花形成的。因此我们调查的开花结实情况是，2003 年的果实数目(2004 年 2 月的球果)，2004 年的花序和果实数目(2004 年 2 月的花序和 2004 年 11 月的球果)，2005 年的花

序和果实数目(2004 年 11 月的花序和 2006 年 3 月的球果), 2006 年的花序数目(2006 年 3 月的花序)。

数据采用 χ^2 (Chi-square)检验, 统计分析使用 SPSS 软件。

4.2.3 种子采集

于 2004 年 10 月下旬在华东师大采种, 共采集 18 棵水杉树的种子(HSD04), 其中 B 区环境科学系周围 3 株、C 区河西食堂周围 2 株、I 区丽娃河南段 1 株、L 区师大一村 12 株, 每株树采集球果 10 个左右(表 4.5)。2004 年 12 月中旬在黄山市汤口镇采集 14 棵水杉树球果(TK04)。当年, 请水杉的原产地的工作人员帮助采集利川县野生水杉母树种子, 于 2004 年 11 月 16 日收到利川寄来的水杉球果(LC04)。共采集忠路镇水杉母树 20 株, 其中拱桥村 5 株、桂花村 10 株、钟灵村 4 株、红沙村 1 株, 每棵约 10 个球果。种子数据处理时, 为了平衡各种群个体数, 我们把利川种群分成桂花种群(GH04)和其它种群(QT04)两个。

2005 年 11 月上旬在华东师大采种, 采集 L 区师大一村 16 株、I 区科学会堂附近 3 株、B 区环境科学系周围 2 株共 21 株水杉树的球果(HSD05)。2005 年 10 月中旬黄山汤口镇采集 24 株水杉树的球果(TK05)。

采集时注意不要让球果掉到地上, 采集回来的球果先放在空气中自然风干, 球果果皮开裂, 这时拿着球果轻轻的敲击里面的种子就可以掉落下来。用信封收集种子。

表 4.5 水杉种子的采集地点及采集个体数目

Table 4.5 The locations and tree numbers of <i>M. glyptostroboides</i> had been collected										
时 间 Time	地 点 Site Number	华东师大(HSD) East China Normal University				黄山市汤口镇 (TK)	利川县忠路镇(LC) Zhonglu town in Lichuan county			
		B 区	C 区	I 区	L 区	Tangkou town in Huangshan city	拱桥村	桂花村	钟灵村	红沙村
							(GQ)	(GH)	(ZL)	(HS)
2004 年		3	2	1	12	14	5	10	4	1
小计			18			14		20		
总计						52				
2005 年		2	-	3	16	24	-	-	-	-
小计			21			24		-		
总计						45				

4.2.4 种子重量和大小

水杉的种子较小, 因此用千粒重表示种子的重量。所有采到的两年的水杉种子分株测量, 每株以 200 粒为单位, 用电子天平称量。求出每株水杉母树 200 粒种子的平均数, 再用平均数换算成 1000 粒种子的重量作为该株树的千粒重, 即

千粒重=200 粒种子的平均重量×5

每个种群以每棵水杉树个体的千粒重作为样本, 进行统计分析, 比较不同种群的种子重量差异。

2004 年采到的水杉树，测量种子大小华师大 17 株，汤口 8 株，利川 20 株。每株随机抽取 20 粒进行种子大小检测样本。由于水杉种子的厚度较小，且不在一个平面上，平放时有皱褶上下起伏，故无法测量厚度，故假设水杉各个体种子厚度无差异，因此只通过检测长和宽来代表种子大小。用螺旋测微尺测量种子的长度和宽度，水杉种子平面近似椭圆型，故用椭圆面积作为种子的大小指标。椭圆面积公式为：

$$S = \pi ab$$

其中 a 是长半径， b 是宽半径。取 20 粒种子面积的平均数作为该母树个体的大小指标，每种群以每个个体指标为样本，比较不同种群水杉种子的大小差异，进行统计分析。

数据采用成组数据平均数的 t 检验进行假设检验，并做种子重量和大小的相关分析。分析使用 SPSS 软件。

4.2.5 水杉种子的发芽

采集后的种子经过一冬天的低温(室温)保存，于 2005 年 3 月 23、24 日种下。种之前先经过 48 小时的 45℃浸种，然后在华东师大生物站玻璃大棚温室中发芽。水杉的种子每 200 粒种于 10×20cm 的长方形花盆里，花盆内装土，种子就播在上面一层，上再覆盖一点沙土。

共栽种 51 个水杉母树的种子，其中华师大 18 个，利川桂花种群 10 个，利川其它种群 10 个，汤口 13 个。桂花、利川其它种群和华师大种群每母树个体分别播 400 粒种子，汤口种群一般每母树个体播种 200 粒。

种子萌发阶段，4 月 5 日开始观察到种子出芽。后于 4 月 8 日、4 月 15 日、4 月 22 日、4 月 30 日分别记录发芽个体数和芽的高度。由此计算萌发的母树比例和每株母树的种子萌发率，即

$$\text{萌发母树比例} = \frac{\text{母树萌发个体数}}{\text{播种母树总个体数}} \times 100\%$$

$$\text{种子萌发率} = \frac{\text{发芽个体数}}{\text{播种总数}} \times 100\%$$

至 4 月 30 日，发芽的水杉幼苗已经长到约 5cm 高，花盆中密度较大，限制了幼苗的进一步长大，故 4 月 30 日把部分个体移栽到直径 7cm 的花盆中，每盆一株苗，确保幼苗有足够的生长空间和营养补充。移栽后的苗仍然放在温室大棚中。分别于 4 月 30 日、5 月 6 日、5 月 13 日、5 月 20 日、5 月 27 日、6 月 13 日、7 月 9 日、8 月 4 日、9 月 8 日、10 月 10 日、11 月 11 日和 12 月 10 日对苗的生长情况做记录。生长期，6 月 21 日气温比较高的时候把苗从温室中移到了室外。过夏天后，小花盆的空间已经不够水杉苗生长，于 9 月 17 日再次移苗，把幼苗从花盆中移入地下的土中，直接生长在土地上，使幼苗提前适应，准备过冬。幼苗长大，种群基本稳定后，10 月 10 日、11 月 11 日和 12 月 10 日测量了幼苗的其它特征，包括幼苗基径(靠地面径基部的直径，stem base diameter(SBD)，用游标卡尺测定)、冠幅(地上部分的最大直径，maximum crown diameter(MCD))和侧枝数(branch number(BN))。

4.2.6 水杉种群的交配系统

4.2.6.1 研究材料

在发芽实验的 3 个种群中，选取能够发芽，且发芽幼苗的个数达到交配系统实验标准的个体，取幼嫩的新鲜叶片作为研究对象。华东师大种群 5 个个体，汤口种群 3 个个体，利川种群 19 个个体。

4.2.6.2 幼苗总 DNA 提取

幼苗从生物站采来后直接用鲜样进行 DNA 提取，采用 CTAB 法，在 Doyle & Doyel(1987)的方法基础上修改而成(Fan *et al.* 2004)。提取第一步是鲜样用液氮快速在研钵里搅成粉末状，以后的方法和程序与第二章的提取方法相同。

4.2.6.3 微卫星实验

4.2.6.3.1 引物的选择

选取水杉近缘种日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)的微卫星引物进行预实验(Moriguchi *et al.* 2003, Tani *et al.* 2004)，预实验引物与上章相同。我们从中选取了 6 对在水杉中扩增条带清晰可辨且多态的引物用于水杉的交配系统实验(表 4.6)。

表 4.6 实验中微卫星引物的序列及 PCR 扩增条件(Moriguchi *et al.* 2003, Tani *et al.* 2004)
Table 4.6 Primer sequences of microsatellite markers and PCR conditions in experiment (Moriguchi *et al.* 2003, Tani *et al.* 2004)

引物名称 Primers	重复单元 Motif	引物序列(5'-3') Sequence	退火温度(°C) Anneal temperature	片段长度(bp) Size
<i>Cjgssr33</i>	(GT) ₂₁	GGTGGTGTAGAGTTGTCACCTT AATTGTCGTTGATTGCTACTTA	62(54)	181
<i>Cjgssr125</i>	(CT) ₁₈	TCTCTGTATATCTCCCAACAATC AGGGAAATAGAGGGAAATAGT	60(54)	142
<i>Cjgssr130</i>	(CT) ₁₃	TCCCTCCCCATCCATCTC GGGTATCATCAAGCCAAAACAA	60(61)	141
<i>Cjgssr140</i>	(CT) ₂₁	GGGAAGAGGGAAAGAGTTCAT GGAGTGGGAGAGAGGTGAG	60(46)	199
<i>Cjgssr142</i>	(GT) ₉ (GA) ₂₁	ACCCAATTTTATAGTGACTCCA CGCATCAACTCGACATAATATC	62(53)	261
<i>CJS0955</i>	(TCT) ₄ (GA) ₂₉	CACACTCCCCGTCTCCGACAG ACCCTGATTCCCCATACACC	58(53)	137

注：退火温度括号中是水杉实验所用的温度。

4.2.6.3.2 PCR 扩增、检测与判译

实验的仪器、药品和反应程序都与第三章相同。

4.2.6.3.3 遗传数据分析

交配系统的遗传分析软件一般用 MLT(Ritland 1990), 但近两年 Ritland 又改进了这个程序的一些功能, 把程序升级为 MLTR(for multilocus t and r)(Ritland 2002)。该程序可以免费从 Ritland 的网站上获得。我们亦用 MLTR v. 3.0 程序进行交配系统的分析。

采用多位点混合交配系统模型测定水杉种群的交配系统。分别采用该模型测定多位点异交率(t_m)和单位点异交率(t_s), $t_m - t_s$ 是多位点异交率与单位点异交率平均值的差值, 若大于零, 表示双亲存在着近交(自交)。该模型通过最大似然程序可以同时得到 3 个参数: 牛顿迭代法(Newton-Raphson, NR)估算异交率、期望值最大法(Expectation maximization, EM)估算花粉库等位基因频率、后代矩阵法估算母株基因型(Ritland 2002)。异交率的估计如下(Ritland & Jain 1981):

$$t = \frac{h}{1 - (p + r/2)}$$

p ——亲代中某一等位基因纯合型频率, r ——亲代该等位基因与其它等位基因的杂合型的频率, h ——这种纯合型母本的子代杂合型频率。

近交衰退是对适合度变化的一种反映, 适合度包含许多成分, 近交衰退可以直接对适合度成分进行测定。由于近交衰退可能发生在生活史任一阶段, 且生活史后期阶段受的影响可能更大, 因此直接测定长寿命木本植物的适合度是非常困难的(陈小勇, 林鹏 2002)。Ritland(1990)提出一种利用自交率和近交系数估测近交衰退程度的方法, 将近交衰退定义为 1 减去自交种子相对于异交种子的相对适合度, 即:

$$\delta = 1 - \frac{2tF'_t}{s(1 + F_{t-1} - 2F'_t)}$$

其中, t 为异交率, s 为自交率, F_t 、 F_{t-1} 分别为 t 和 $t-1$ 世代的近交系数。当不同世代间种群的近交系数基本不变时, 上式可以简化为:

$$\delta = 1 - \frac{2F(1-s)}{s(1-F)}$$

计算时各参数选择如下: 初始异交率为 0.5, 双亲近交系数设为 0.2, 计算异交率时最大迭代次数采用建议的 25 次, 自展(bootstrap)次数为 100 次, 重复取样设为家系间。花粉库与胚珠库基因频率假设相等。采用概率法(修改自 Brown & Allard(1970)方法)选择亲本。

4.3 结果

4.3.1 华东师大水杉的分布与年龄结构

4.3.1.1 水杉的分布

在研究面积约 937,900m² 的华东师大一带, 共生长水杉树 2086 株, 平均密度为 0.002 株/m²。有些树下、林下种植了草本植物; 有些水杉单独种植, 人们活动比较多的地方树下是裸露的土壤, 人们活动相对少的树下有灌木、杂草出现, 但都未见有水杉幼苗。15 个分区的水杉分布情况如下表(表 4.7)。

A 区长风一村和 L 区师大一村是两片居民住宅区，居民楼之间种的主要乔木就是水杉，整齐的排列成一行。师大一村平均一幢楼前有十几或二十几棵水杉树，比长风一村种的稍密一些，树下其它植物都不多，不成群落，只有零星的一些草本出现。两片区域水杉树的高度约 20m，胸高粗度一般在 20-30cm。师大一村在某两幢居民楼间有几棵较大的树，大树与大树之间挨的都比较近，大致每两棵间 5m 距离。

表 4.7 华东师大水杉分布情况

Table 4.7 The distribution of *M. glyptostroboides* individuals in ECNU

区域 Subarea	地点 Site	个体数(株) Number	分布形式 Form		面积(m²) Area	密度 (株/10 m²) Density
			成林 Forest	成行 Row		
A 区	长风一村	47		√		
B 区	环科系、网球场	45		√		
C 区	河西食堂	17		√		
D 区	游泳池	32		√		
E 区	图书馆	272	√		1,770	1.537
F 区	化学系	63		√		
G 区	办公楼	114	√		1,030	1.107
H 区	地理馆	241	√		2,220	1.086
I 区	丽娃河南段	253		√		
J 区	文科大楼	15		√		
K 区	幼儿园	6		√		
L 区	师大一村	529		√		
M 区	工会	153	√		750	2.040
N 区	枣阳路	53		√		
O 区	原师大二附中	246		√		
总计		2086			5770	1.352

注：面积只包括水杉成林分布的区域。

水杉作为行道树栽种的地方一般是办公楼附近和道路、河流一侧。这些地点有 B 区的环境科学系周围、D 区游泳池附近(不远是一个学生宿舍楼，栽种有几行水杉树)、F 区化学系楼前的丽娃河北段边上、I 区丽娃河南段两侧、N 区枣阳路一侧和 O 区原师大二附中的一部分。这些地方的水杉树也种植的非常整齐，成一行或几排排列，树下一般都种有单一草本植物麦冬草(*Ophiopogon japonicus*)。枣阳路上由于管理不多，水杉树下已经长满了灌木和其它杂草。环境科学系周围的水杉树下主要长有常绿灌木八角金盘(*Fatsia japonica*)，另外夏秋季还稀疏的长有马兰(*Kalimeris indica*)、蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)、婆婆纳(*Veronica didyma*)、一年蓬(*Erigeron annuus*)等草本植物。

E 区图书馆周围、G 区办公楼西面靠近丽娃河边、H 区的地理馆西面和 M 区一村工会北面丽娃河边都是成林的水杉树，环境优美。这些地方水杉成林，我们测量了林地的面积，计算出水杉林的密度，如表 4.7 所示。E 区图书馆附近共有水杉树 272 株，所占面积为 1770m²，

平均每 10 m² 有 1.537 棵树;G 区办公楼西面有树 114 株,面积为 1030 m²,平均每 10 m² 1.107 棵;H 区地理馆后 241 株,面积 2220 m²,平均 10 m² 有 1.086 棵;M 区工会北面 153 株,面积 750 m²,密度 2.040 株每 10 m²。工会附近水杉林的密度最大,办公楼和地理馆的水杉林密度相似。

C 区河西食堂、J 区文科大楼和 K 区幼儿园三地点都只有零星的几株水杉树。

4.3.1.2 水杉的径级结构

师大 15 个分区水杉树胸径等级的个体数见表 4.8。测量水杉总个体 1997 株,分属于 1-9 等级,即师大种群内所有水杉树的胸径都在 0-45cm 之间,平均胸径为 21.24cm。但在 O 区原师大二附中校门外的枣阳路上,有一株胸径级 14 的大水杉树,胸径达 68.98cm,是华东师大水杉种群中最大的一株。除此之外,该区胸径等级几乎在 2-6 之间。

表 4.8 各个胸径等级的个体数

Table 4.8 The tree numbers of each size-class													
区域 Subarea	总个体 数 Number	平均胸 径(cm) Mean DBH	胸径等级 Size-class										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10-13	14
A 区	47	20.69	-	1	9	9	16	12	-	-	-	-	-
B 区	45	24.31	-	5	2	7	8	12	5	5	1	-	-
C 区	17	25.56	-	1	-	1	5	7	2	1	-	-	-
D 区	32	23.30	1	-	1	8	9	7	5	1	-	-	-
E 区	195	19.41	-	3	42	62	62	19	6	1	-	-	-
F 区	63	23.19	-	1	8	11	18	17	7	-	1	-	-
G 区	114	19.88	-	4	15	44	30	14	5	2	-	-	-
H 区	241	18.98	-	9	29	115	83	13	2	-	-	-	-
I 区	253	23.04	-	6	21	45	82	68	25	3	3	-	-
J 区	15	18.69	-	-	6	3	3	3	-	-	-	-	-
K 区	6	23.60	-	-	1	1	2	1	1	-	-	-	-
L 区	517	20.76	1	22	71	104	196	86	20	5	2	-	-
M 区	153	16.44	3	27	40	37	32	9	4	1	-	-	-
N 区	53	23.65	-	-	5	6	22	15	3	2	-	-	-
O 区	246	17.16	-	28	77	62	56	20	2	-	-	-	1
总计	1997	21.24	5	107	327	515	624	303	87	21	7	-	1

注: L 区共有 529 株,由于 12 株被私宅挡住,故测量 517 株树胸径;E 区共有 272 株,由于 77 株被围墙围住,故测量 195 株;共 2086 株树,89 株未测到,测量胸径树 1997 株。

华东师大水杉种群中胸径最小的水杉树是 M 区工会附近的一株,胸径只有 3.85cm,高度约 6 米。M 区是一片水杉林,其间水杉种植的较密,该区 153 株树的胸径几乎都分布在 2-5 等级。师大种群内属于第一等级的总共只有 5 株树,而该区就有 3 株。此区水杉个体密度是四个林中最大的,胸径都较小。

E 区在老图书馆的北面一带,这里水杉树较多,共 272 株。成两个水杉林分布,另外在

路边上还有一些成行分布，其中一个林子“几”字形的楼中间，三面环楼，另一面被铁丝网围住，无法测量胸径，但据观测其胸径大小和外面的林子的树相似。该区共测量 195 株树的胸径，大都位于 3-6 等级间。这一带虽然个体数不少，但胸径却不是很大。

同为水杉林的办公楼西面的 G 区水杉个体数虽多，但胸径等级不大，在 3-6 间，4、5 等级的个体数占种群的 65%；H 区地理馆西面的两片水杉林和 G 区相似，胸径也大都都在 3-6 间，4、5 等级居多，占 78%。这两片林子的密度也相仿。

B 区环境科学系和网球场一带的水杉树成行道树分布，胸径范围较宽，从 2-9 等级都有，并且大树较多，第 6 等级(25-30cm)有 12 株，占 27%，另外 7、8、9 等级共有 11 株，是含有大树较多的一个区；F 区化学系东边沿河一线成行的水杉树胸径几乎在 3-7 等级间；丽娃河南段的 I 区沿河分布的水杉树胸径等级相对稍大一些，5、6 等级的树较多，值得一题的是该区有几棵较大的树，第 9 等级的 7 棵树中该区就有 3 棵；枣阳路上的 N 区的行道树径级分布主要也在 5、6 上。

位于住宅区的水杉树也作为行道树分布：师大一村 L 区水杉树分布较多，有 529 株。能测量到的 517 株个体，分布在 3-6 等级间，第 5 等级的树最多。该区有几株大树，第 9 等级的 7 棵树中该区有 2 棵，第 8 等级 21 棵该区占了 5 棵。A 区长风一村的树胸径除一株属于 2 等级外，其余也全部在 3-6 等级之间，但没有大树。

C 区河西食堂有水杉树不多，大部分分布在 5、6、7 等级；D 区游泳池周围水杉树大部分在 4-7 等级间，但有株第 1 等级的树，夹在几棵大树中间，胸径为 4.94cm；J 区、K 区树较少，胸径在 3-6 等级间。

华东师大水杉种群总测量的 1997 株树的胸径，几乎分布在 2-7 等级间，其中 4、5 两等级共有 1139 株，占总个体数的 57%，说明师大种群以胸径 15-25cm 的树为主。胸径分布图如下(图 4.2)。

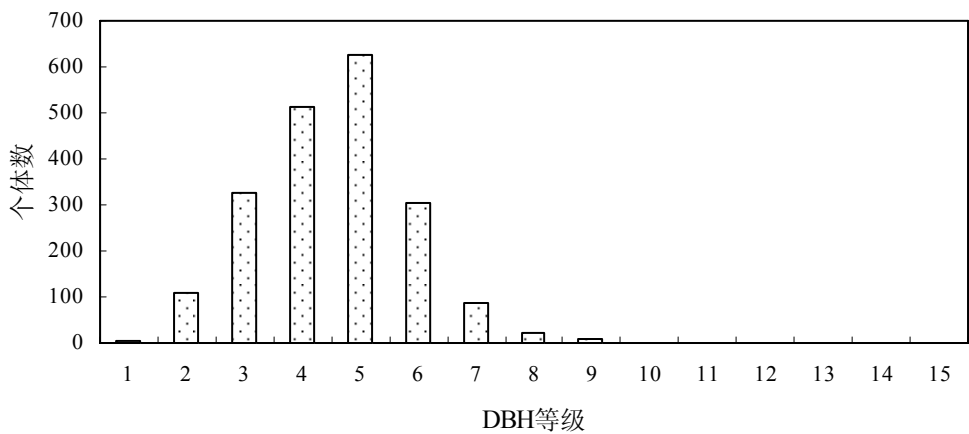


图 4.2 华东师大水杉种群个体数在各个年龄等级的分布

Table 4.2 Size-class distribution of the *M. glyptostroboides* population in ECNU

4.3.2 华东师大水杉开花与结实情况

分别调查了 2003 年、2004 年、2005 年和 2006 年四年华东师大种群水杉的开花和结实

情况(表 4.9)。华东师大种群共有水杉树 2086 棵，2003 年具有球果的水杉树共有 188 棵，占 9.01%；2004 年具有雄花序的树共 50 棵，占 2.40%，具有球果的共 134 棵，占 6.42%；2005 年具有雄花序共 26 棵，占 1.25%，具有球果 133 棵，占 6.38%；2006 年具有雄花序的水杉树共有 40 棵，占 1.92%。

表 4.9 华东师大水杉种群 2003、2004、2005 和 2006 年开花及结实情况

Table 4.9 Flowering and fruit set in 2003, 2004, 2005 & 2006 of ECNU *M. glyptostroboides* population

区域 Subarea	个体数 (株) Number	胸径 (cm) DBH	个体数 Number of trees					
			2003 年	2004 年	2005 年	2006 年		
			Year 2003	Year 2004	Year 2005	Year 2006		
			具球果 Setting cone	具雄花序 Setting male inflorescence	具球果 Setting cone	具雄花序 Setting male inflorescence	具球果 Setting cone	具雄花序 Setting male inflorescence
A 区	47	20.69	9(19.15%)	1(2.13%)	7(14.89%)	7(14.89%)	5(10.64%)	1(2.13%)
B 区	45	24.31	8(17.78%)	6(13.33%)	9(20.00%)	2(4.44%)	7(15.56%)	3(6.67%)
C 区	17	25.56	8(47.06%)	6(35.29%)	12(70.59%)	3(17.65%)	6(35.29%)	4(23.53%)
D 区	32	23.30	9(28.13%)	1(3.13%)	5(15.63%)	1(3.13%)	6(18.75%)	1(3.13%)
E 区	272	19.41	1(0.37%)	2(0.74%)	2(0.74%)	-	5(1.84%)	5(1.84%)
F 区	63	23.19	4(6.35%)	2(3.17%)	9(14.29%)	-	2(3.17%)	1(1.59%)
G 区	114	19.88	2(1.75%)	3(2.63%)	2(1.75%)	-	-	2(1.75%)
H 区	241	18.98	1(0.41%)	1(0.41%)	2(0.83%)	-	-	-
I 区	253	23.04	38(15.02%)	4(1.58%)	13(5.14%)	-	21(8.30%)	8(3.16%)
J 区	15	18.69	-	-	-	-	-	-
K 区	6	23.60	-	-	-	-	-	-
L 区	529	20.76	83(15.69%)	22(4.16%)	50(9.45%)	8(1.51%)	68(12.85%)	15(2.84%)
M 区	153	16.44	-	-	-	-	-	-
N 区	53	23.65	4(7.55%)	-	4(7.55%)	1(1.89%)	5(9.43%)	-
O 区	246	17.16	21(8.54%)	2(0.81%)	19(7.72%)	4(1.63%)	8(3.25%)	-
总计	2086	21.24	188(9.01%)	50(2.40%)	134(6.42%)	26(1.25%)	133(6.38%)	40(1.92%)

注：表中括号中为该值在该区所占的比例，“总计”括号中为该值在总数中占的比例；“-”代表 0。

4.3.2.1 03-05 年结果实和 04-06 年开花的比较

对 03、04、05 年三年具有球果和 04、05、06 年具有雄花序进行 χ^2 检验，球果 03 年极显著多于 04、05 年，04 和 05 年无差异。03 年结的球果最多，04 和 05 年结果数一样。但雄花序 04 年极显著多于 05 年，但和 06 年无差异，05 和 06 年也无差异。

各区情况不一致，雄花序比例大部分区域 04 年比 03 年低，甚至有些区域 03 年有 04 年整个种群中都没有雄花序的个体，如 E、F、G、H、I 区，但个别区域(A、N、O 区)04 年却比 03 年高一些。具有球果的比例虽然有 5 个区(B、C、E、F、H 区)04 年都比 03 年高一些，但其它区域要么与上年持平，要么就低于上年，而且有些区域如 D、I 和 L 区 04 年比 03 年大幅度降低，导致总体具球果个体数不如上年多的情形。并且有些区域的雄花序和球

果的变化并不一致，雄花序比例增大的区域球果比例不一定增大，甚至反而减少(如 A 区)。

表 4.10 各年间球果和雄花序的 χ^2 检验

Table 4.10 χ^2 -test for cones and male inflorescences between years

		球果		雄花序	
		Cone		Male inflorescence	
		χ^2	p	χ^2	p
2003	2004	9.813**	0.002	-	-
	2005	10.209**	0.001	-	-
2004	2005	0.004	0.950	7.720**	0.005
	2006	-	-	1.136	0.287
2005	2006	-	-	3.017	0.082

注：*表示差异显著($p<0.05$)；**表示差异极显著($p<0.01$)。

4.3.2.2 具雄花序数和具球果数之间的比较

华东师大水杉种群 2004 年和 2005 年具雄花序数目和球果数目比较请见下图。华东师大种群长有雄花序的个体 04 和 05 年分别是 50 和 26 个，结有球果的个体数两年分别为 134 和 133 个，结有球果的个体数达具雄花序的个体数的 2.68(134/50)和 5.12(133/26)倍之多。

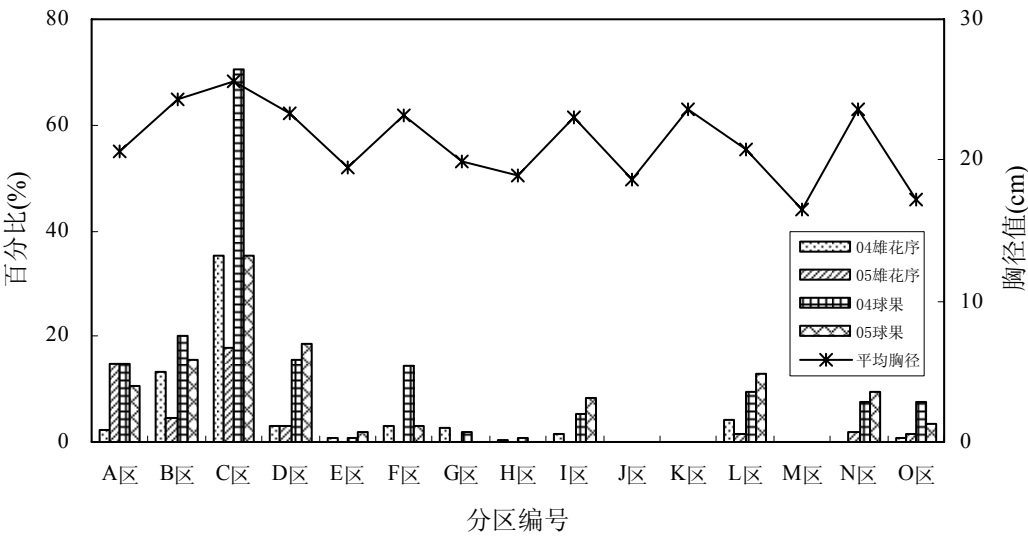


图 4.3 华东师大水杉种群胸径及 2004 年和 2005 年开花及结实情况

Figure 4.3 DBH and flowering and fruit set of ECNU *M. glyptostroboides* population in 2004 and 2005

经 χ^2 检验，各区 2004 年和 2005 年长有球果的水杉个体数量和长有雄花序的个体有极显著差异($p<0.01$)，球果比雄花序的数量多，几乎无一例外，有些区域就干脆只有结球果的个体却未发现长有雄花序的个体。具雄花序的个体数量比例一般在 10%以下，而有球果的个体数量比例一般在 10%上下浮动。

具雄花序和球果数最多的是 C 区，也就是河西食堂附近，这里虽然水杉树只有 17 棵，但具雄花序的比例 2004 年和 2005 年分别是 35.29%和 17.65%，具球果的比例两年分别可达 70.59%和 35.29%。

G 区办公楼西边一片的水杉具有雄花序和球果的个体比例都较小，分别只有百分之一或二点多。E 区图书馆和 H 区地理馆两区有雄花序和球果的比例则更小，几乎不到百分之一。而 M 区的工会西边水杉林内无一开花结实的。

J 区和 K 区的水杉数量比较少，个体基本上未到成熟年龄，因此都未有开花结实现象。

4.3.2.3 与胸径的关系

以各区域的胸径值和雄花序及球果的百分比分别做相关分析(表 4.11)。各区域的胸径的平均值和各年具球果的个体数都显著相关，胸径也与 2004、2006 年具雄花序的个体数也显著相关，说明年龄较大的种群产生雄花序和球果的个体比例较多。直观地从图 4.3 上也可以看出来，可以看出雄花序和球果的多度大致随胸径的大小而变化，具有雄花序和球果比例最大的区域是 C 区河西食堂周围一片水杉树，这个区域的水杉平均胸径值在左右区域也是最大值 25.56cm。

胸径与 05 年具雄花序的个体比例呈不显著相关，可能是因为一半的种群雄花序值为零所影响。总体来看，水杉人工种群的开花结实与年龄大小有显著关系。

表 4.11 各区域平均胸径与雄花序和结实的相关分析

Table 4.11 Correlations between averaged DBH and the male inflorescences and fruit set

胸径 DBH	个体比例 Proportion of trees					
	2003 年 Year 2003		2004 年 Year 2004		2005 年 Year 2005	
	具球果 Setting cone	具雄花序 Setting male inflorescence	具球果 Setting cone	具雄花序 Setting male inflorescence	具球果 Setting cone	具雄花序 Setting male inflorescence
相关系数 <i>r</i>	0.614*	0.552*	0.586*	0.393	0.664**	0.558*
概率 <i>p</i>	0.015	0.033	0.022	0.147	0.007	0.031

注：*表示显著相关($p<0.05$)；**表示极显著相关($p<0.01$)。

4.3.3 水杉种子形态特征

4.3.3.1 水杉种子重量

2004 年和 2005 年两年采种，称量、计算 6 个种群(HSD04、TK04、GH04、QT04、HSD05、TK05)的平均千粒重如图 4.4。千粒重最大的种群是原产地利川的桂花种群(GH04)，为 $2.6272 \pm 0.3508\text{g}$ ；其次是利川的其它种群， $2.5265 \pm 0.5432\text{g}$ ；然后是黄山汤口种群，TK05 为 $2.1039 \pm 0.3704\text{g}$ 以及 TK04 为 $1.8257 \pm 0.6103\text{g}$ ；千粒重最小的是华东师大种群，分别为 HSD04 的 $1.0557 \pm 0.3138\text{g}$ 和 HSD05 的 $0.8659 \pm 0.2957\text{g}$ 。各种群变异系数分别为 GH04 13.35%，QT04 21.50%，TK05 17.60%，TK04 33.43%，HSD04 29.72%，HSD05 34.15%，华东师大种群种子重量变异最大，桂花种群变异最小。

水杉原产地利川两种群的种子重量极显著地大于人工种群。

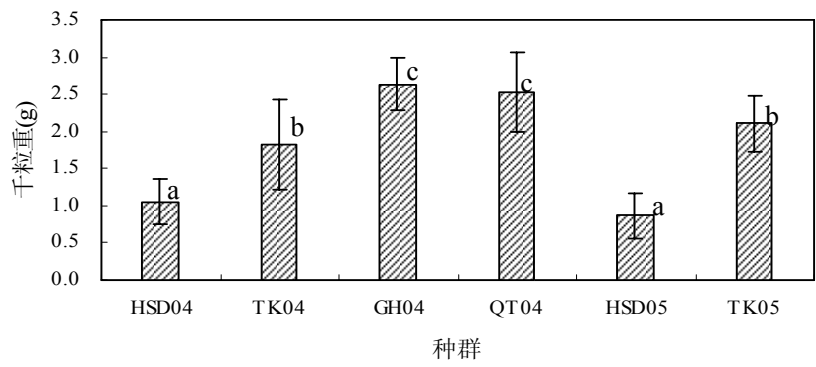


图 4.4 每种群的平均千粒重

Figure 4.4 Seed weight($\times 1000g$) of *M. glyptostroboides* population

注：a 与 b 有极显著差异($p<0.01$)，a 与 c 有极显著差异($p<0.01$)，b 与 c 有极显著差异($p<0.01$)。

4.3.3.2 水杉种子大小

通过测量种子的长度和宽度值计算面积大小，结果如图 4.5。桂花种群、利川其它种群和汤口种群的大小分别为 $0.147\pm 0.016\text{ cm}^2$ 、 $0.145\pm 0.011\text{ cm}^2$ 和 $0.140\pm 0.017\text{ cm}^2$ 。华东师大种群种子大小为 $0.101\pm 0.022\text{ cm}^2$ 。各种群的变异系数分别为 GH04 10.88%，QT04 7.59%，TK04 12.14%，HSD04 21.78%，种子大小变异最大的还是华东师大种群，最小的是利川其它种群。

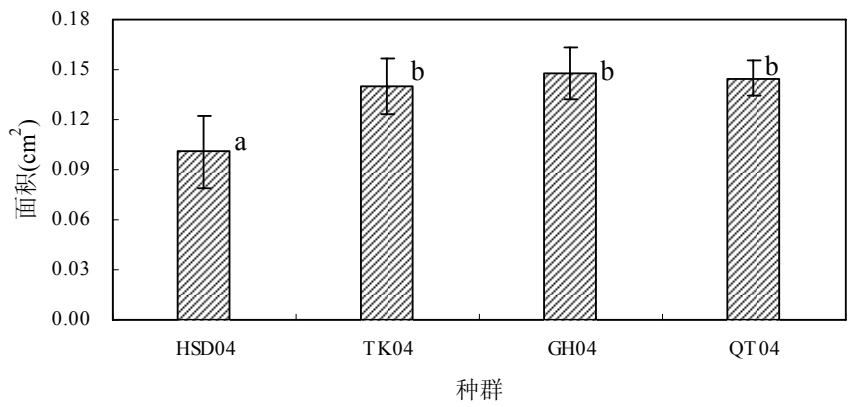


图 4.5 每种群种子的平均大小

Figure 4.5 Seed size of *M. glyptostroboides* populations

注：a 与 b 有极显著差异($p<0.01$)。

由于黄山汤口种群水杉种子的种翅较大，因此其种子重量与利川两种群有极显著差异，但大小却与利川两种群无差异，说明汤口种群种胚的大小小于利川种群。华东师大种群的种子无论从重量还是大小方面，都极显著小于原产地利川两个种群，表明华东师大的水杉种子质量还远远落后于野生水杉种群的种子质量。

4.3.3.3 水杉种子重量和大小的相关分析

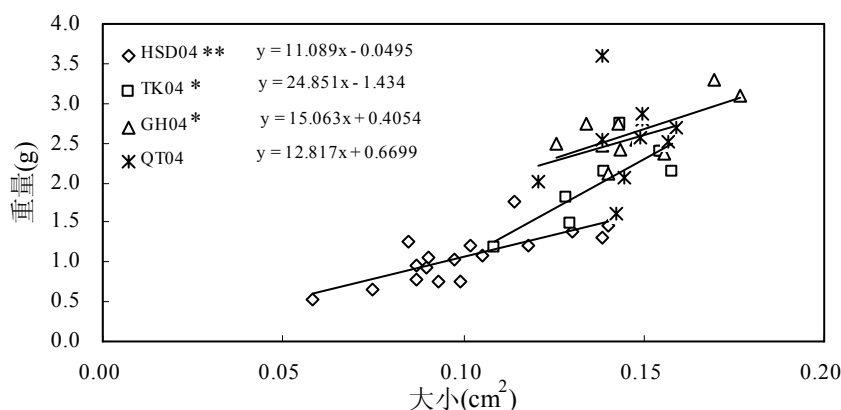


图 4.6 种子大小和重量的关系图

Figure 4.6 Correlations between size and weight of seeds

注: *表示显著相关($p < 0.05$), **表示极显著相关($p < 0.01$)。

对 04 年 4 个种群各自的种子重量和大小分别做相关分析。华东师大种群的两指标相关性最大,为极显著相关。黄山种群为显著相关。利川的桂花种群的种子重量和大小显著相关,但利川其它种群的种子重量和大小不呈相关关系。4 个种群种子重量和大小散点图如下(图 4.6)。图中也可看出利川其它种群偏离直线较远,两指标不成线性相关。

种子重量和大小(面积)除利川其它种群外,另 3 个都相关。说明利川其它种群种子大小变异不大的情况下,种子厚度等方面也对重量有影响,各个个体之间差异也比较大。

4.3.4 水杉种子发芽

2004 年采于 51 个水杉个体的种子进行发芽实验,其中华东师大种群 18 棵,汤口种群 13 棵,桂花种群 10 棵,利川其它种群 10 棵。

4.3.4.1 种子的萌发

从 3 月 23 日种子种下,至 4 月 30 日移苗,为水杉种子的萌发期。在此期间,种子种下第 14 天(4 月 5 日)开始观察到出芽现象。我们于 4 月 8 日、4 月 15 日、4 月 22 日、4 月 30 日分别记录了每个水杉母树种子发芽的个体数及芽的高度。萌发情况如表 4.12。

4 个水杉种群的萌发比例原产地利川的两个种群优势最明显,都为 100%,其次为汤口种群,为 53.8%,华东师大种群萌发比例较少,为 44.4%。经检验,种子萌发率也是利川两种群最高,各为 32.85%和 27.78%,桂花种群最高个体的萌发率达到 49%。其次是汤口种群 8.94%,最后是华东师大种群为 4.34%,华东师大和汤口种群萌发率无差异。从下图中可以更加直观的看出,华东师大和汤口种群的萌发率比较平缓上升,而原产地利川两种群的萌发率上升相对幅度大一些,说明利川两种群的萌发速度较快,且萌发率明显高于两人工种群。

表 4.12 水杉萌发母树比例和种子萌发率

	栽种个体数 Number of planted trees	萌发个体数 Germinate of trees	萌发比例 Proportion of germinate	平均萌发率 Mean germinate rate	最高萌发率 Highest germinate rate	最低萌发率 Lowest germinate rate	平均高度(cm) Mean height
HSD	18	8	44.4%	1.93%	10.00%	0.00%	2.92±0.25
TK	13	7	53.8%	5.75%	21.21%	0.00%	3.57±0.55
GH	10	10	100%	32.85%	49.00%	19.50%	3.29±0.37
QT	10	10	100%	27.78%	46.75%	2.50%	2.98±0.28

注：平均高度为 4 月 30 日萌发期末测得的高度平均值。

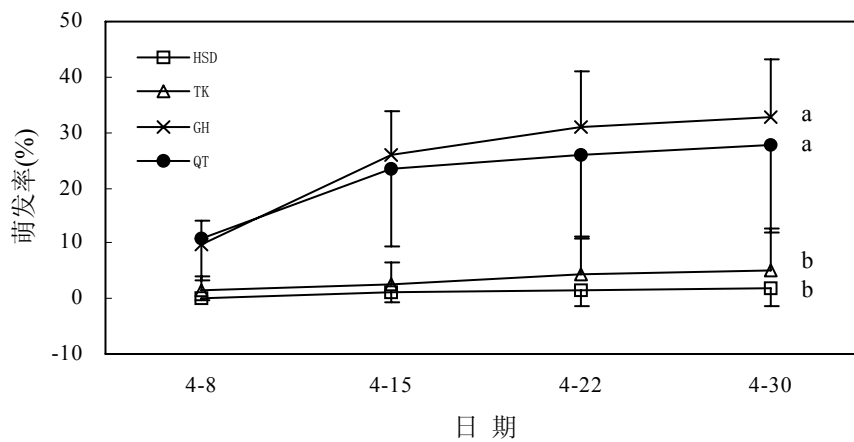


图 4.7 水杉种子的萌发率

Table 4.7 Germinated rates of each population of *M. glyptostroboides*

注：a 与 b 差异为极显著($p < 0.01$)。

4.3.4.2 幼苗的生长——高度变化

从 4 月 30 日，把部分水杉幼苗转移，使每株小苗单独生长在一个花盆里，直至长大，再移到土里。分别于 4 月 30 日、5 月 6 日、5 月 13 日、5 月 20 日、5 月 27 日、6 月 13 日、7 月 9 日、8 月 4 日、9 月 8 日、10 月 10 日、11 月 11 日和 12 月 10 日对苗的生长高度记录。对 4 个种群各阶段的平均高度做趋势图如下。

图中可以看到，6 月 13 日前幼苗生长都较缓慢，此后至 10 月份幼苗生长速度加快，冬季来临的 11 月到 12 月间，幼苗的高度生长又趋于平缓。

从 4 月 30 日起至 6 月 13 日约一个半月的时间里，4 个种群的平均高度相似。此后，汤口种群平均高度比自身前期有所降低，主要是由于个别生长高度较高的个体死亡造成(该水杉母树 6 月 13 日的幼苗为 28 个，到 7 月 9 日只剩 19 个幼苗)，此后虽然汤口种群的死亡率基本稳定，但该种群的平均高度仍然一直低于师大和利川两种群(差异显著)。师大和利川两种群高度基本持平，但在 9 月 8 日之后利川两种群的平均高度开始有偏高的趋势，但 3 个种群高度无差异。

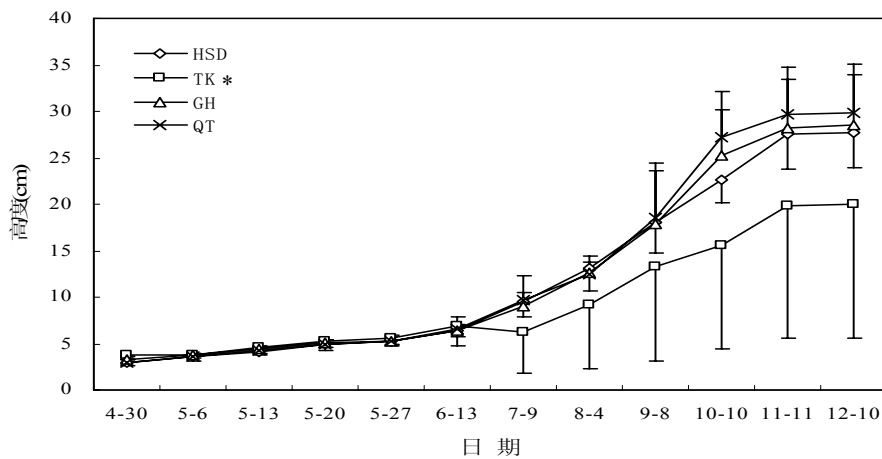


图 4.8 幼苗生长期 4 个种群平均高度变化图

Figure 4.8 Average heights of seedlings of 4 populations

注：*表示与其它有显著差异($p<0.05$)。

4.3.4.3 幼苗的其它特征

10 月 10 日、11 月 11 日、12 月 10 日分别测量幼苗的基径、冠幅和侧枝数。平均侧枝数华东师大种群 10 月至 12 月分别为 12.16 ± 1.91 个、 14.63 ± 2.88 个和 14.63 ± 2.88 个；汤口种群三个月分别为 11.90 ± 1.95 、 14.96 ± 2.89 和 14.96 ± 2.89 个；桂花种群分别为 12.84 ± 1.27 、 14.80 ± 1.54 和 14.80 ± 1.54 个；利川其它种群分别为 12.04 ± 2.65 、 14.24 ± 2.92 和 14.24 ± 2.92 个。4 个种群的 11 月和 12 月侧枝数都没有变化。经检验，4 个种群基径、冠幅、侧枝数之间均无差异(图 4.9)。

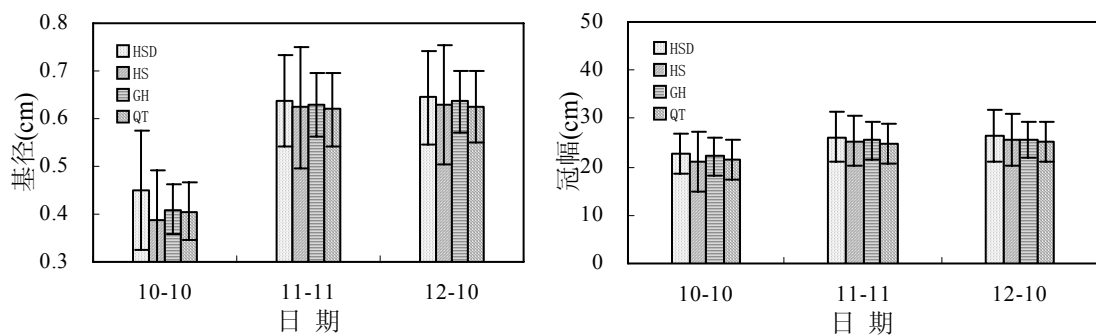


图 4.9 幼苗基径和冠幅变化

Figure 4.9 Changes of SBD and MCD of seedlings

4.3.5 交配系统

交配系统分析中，华东师大种群分析的植株数为 5 个，分别是 1、2、16、17、18 号个体，共 35 个种子萌发成幼苗的基因型，平均每个个体分析的种子数为 7 个；利川桂花种群共分析植株数 10 个，102 个幼苗的基因型，平均每个个体种子数 10.2 个；利川其它种群分析植株数 9 个，88 个幼苗基因型，平均 9.78 个；汤口种群由于可供分析的个体太少，无法分析。

表 4.13 用于交配系统分析的个体及幼苗数

Table 4.13 Individual and the number of seedlings for the analysis of mating system					
种群	植株数	个体编号	幼苗个数	幼苗总数	平均每个体幼苗数
Population	No. of trees	Seedling	No. of seedlings	Total no. of seedlings	No. of seedlings per trees
HSD	5	1、18	6	35	7
		2	7		
		16、17	8		
GH	10	1、4、6	10	102	10.20
		2	9		
		3	7		
		5、7、8、10	11		
		9	12		
QT	9	1、9	9	88	9.78
		5	10		
		2、6、7、8	11		
		3、4	8		

4.3.5.1 等位基因频率

用 MLTR 程序采用最大似然法算出的各种群花粉库和胚珠库各位点常见等位基因的频率见下表。6 个位点共有等位基因 15 个，平均每个位点 2.5 个。但是 4 个种群没有一个种群包含所有 15 个等位基因。所有等位基因的频率分布几乎全部在 0-0.100 和 0.900-1.000 之间，也就是说每个位点都存在一个等位基因为主的现象。

桂花种群的常见等位基因最多为 14 个，比全部等位基因只少 *Cjgssr140* 位点的一个，而这个等位基因是华东师大种群独有的。6 个位点中 5 个是多态位点，只有一个为单态，最多一个位点含有 4 个等位基因(*Cjgssr130*)，特有等位基因最多，有 4 个。另一个原产地种群常见等位基因为 9 个，6 个位点有 3 个多态 3 个单态，无特有等位基因。华东师大种群有 10 个等位基因，6 个位点有 3 个是多态位点。其中一个位点还有一个特有等位基因，但频率不高，只有 0.025。黄山种群由于只有两个母树个体，只有一个位点有两个等位基因，其余位点都只有一个等位基因。

表 4.14 4 个种群的花粉库和胚珠库各位点等位基因频率

Table 4.14 Pollen and ovule frequencies of the alleles of 4 populations

位点	等位基因	HSD 种群	TK 种群	GH 种群	QT 种群
Locus	Allele	Population of HSD	Population of TK	Population of GH	Population of QT
<i>Cjgssr33</i>	A	1.000(0.000)	1.000(0.000)	0.969(0.015)	0.992(0.008)
	B	-	-	0.031(0.015)	0.008(0.008)
<i>Cjgssr142</i>	A	1.000(0.000)	1.000(0.000)	0.988(0.008)	1.000(0.000)
	B	-	-	0.012(0.008)	
<i>Cjgssr125</i>	A	1.000(0.000)	1.000(0.000)	0.994(0.006)	1.000(0.000)
	B	-	-	0.006(0.006)	
<i>CJS0955</i>	A	0.041(0.033)	0.113(0.003)	0.059(0.112)	0.005(0.006)
	B	0.021(0.016)		0.008(0.008)	
	C	0.938(0.031)	0.887(0.003)	0.933(0.111)	0.995(0.005)
<i>Cjgssr130</i>	A	0.022(0.020)	-	0.047(0.081)	0.032(0.016)
	B	-	-	0.022(0.011)	
	C	0.978(0.020)	1.000(0.000)	0.898(0.131)	0.968(0.016)
	D	-	-	0.032(0.115)	
<i>Cjgssr140</i>	A	0.025(0.038)	-		-
	B	0.975(0.038)	1.000(0.000)	1.000(0.000)	1.000(0.000)

注：“-”表示位点的该等位基因频率为 0；花粉库和胚珠库的等位基因相等；括号中为标准差。

4.3.5.2 异交率

用 MLTR 程序分别估计了 4 个种群的单位点异交率(t_s)和由多位点联合估测的异交率(t_m)以及近交系数(表 4.15)。

表 4.15 3 个种群的异交率

Table 4.15 Outcrossing rates of 3 populations

位点	HSD 种群	GH 种群	QT 种群
Locus	Population of HSD	Population of GH	Population of QT
<i>Cjgssr33</i>	-	1.005±0.431	-
<i>Cjgssr142</i>	-	-	-
<i>Cjgssr125</i>	-	-	-
<i>CJS0955</i>	1.171±0.143	1.063±0.340	-
<i>Cjgssr130</i>	0.660±0.596	1.091±0.298	1.081±0.340
<i>Cjgssr140</i>	0.780±0.572	-	-
t_s	0.870±0.437	1.053±0.356	1.081±0.340
t_m	1.200±0.002	1.185±0.109	-

注： t_s 是由多位点联合估测时得到的单位点异交率； t_m 是由 *CJS0955*、*Cjgssr130* 两位点估测的多位点异交率；“-”为纯合或最常见等位基因的频率大于 0.98 的位点。

华东师大种群 3 个多态位点的单位点异交率从 0.660 ± 0.596 至 1.171 ± 0.143 。桂花种群 3 个多态位点的单位点异交率比较均匀, 分别为 1.005 ± 0.431 、 1.063 ± 0.340 和 1.091 ± 0.298 。利川其它种群 1 个多态位点的单位点异交率为 1.081 ± 0.340 。黄山种群由于个体数较少, 不足以进行异交率的计算。

由 CJS0955、Cjgssr130 两位点估测的华东师大和桂花种群的多位点异交率, 华东师大种群为 1.200 ± 0.002 , 略高于桂花种群(1.185 ± 0.109)。

4.3.5.3 相对适合度

从播种至种子萌发阶段结束(4 月 30 日), 各种群的相对适合度如下表:

表 4.16 各种群个体的相对适合度

Table 4.16 Relative fitness of seeds of 4 populations				
	HSD 种群	TK 种群	GH 种群	QT 种群
	Population of HSD	Population of TK	Population of GH	Population of QT
播种种子数	7200	1932	4000	4000
萌发末期幼苗数	139	111	1314	1111
存活力	0.0193	0.0575	0.3285	0.2778
相对适合度	0.059	0.175	1	0.846

桂花种群存活力最高, 以其相对适合度为 1, 利川其它种群的相对适合度为 0.846。两个人工种群相对适合度极小, 汤口种群为 0.175, 大致相当于桂花种群的 1/6, 而华东师大种群大致只有桂花种群的 1/17, 仅为 0.059。

4.4 讨论

4.4.1 水杉人工种群的种子形成和幼苗生长

我们以上海华东师范大学和黄山汤口两人工水杉种群为例, 从开花、交配系统、结实、产种、幼苗生长等一系列过程把水杉人工种群与湖北利川水杉自然种群进行对比。

经调查, 华东师大种群 2003 年具球果数 188 株, 多于 2004 年的 134 株和 2005 年的 133 株。2004 年具有雄花序的个体数 50 株, 多于 2005 年的 26 株, 但 2006 年的又比 05 年多, 为 40 株。虽然具有雌花芽的数量难以统计, 但结球果的数量一定程度上也可以代表具雌花芽的情况。从以上几年的情况来看, 华东师大的水杉开花和结实情况各年间不同, 开花呈“多一少一多”的趋势, 结实有“多一少一少”的趋势。黄山的水杉生长旺盛, 年年开花结实(方德年等 2002), 但据我们观察, 黄山的近两年结实情况也有多少之分, 黄山汤口镇种群水杉树都集中长在马路的两侧, 长约 3000 米, 树木较大, 胸径大都约 50cm。据观察, 黄山种群 2004 年几乎有一半的水杉个体都结有种子, 据说这还是结果较少的一年。但 05 年再观察时结果实的形式更差, 只有少数的树上结果, 并且每棵树结球果的数量的也比上年少。据估计, 04 年黄山种群每棵树大约结球果 500-600 个, 而 05 年只有 50 个左右。原产地水杉的结实有“丰—平—歉—歉”的规律(王希群 1994), 有明显的丰歉年(王希群等 2005), 水杉人工

种群也沿袭了这些规律，结种有大小年之分。而且一个种群内的每个个体结实也有大小年之分，因此华东师大种群各区域各年间的开花结实情况也不尽一致，形成了有些区域比上年高而有些区域比上年低的形式。结实大小年的情况在植物中属于常见现象，比如侧柏中也有结实大小年的情况，大小年间隔一般为 1-2 年，株间结实大小年出现的时间也不一致(李书靖等 2000)。火炬松经调查也有此现象，Pinder 等(1995)报道 1985 年的种子产量远远少于 1986 和 1987 年。

原产地利川种群的种子无论重量还是大小都明显大于华东师大种群，黄山汤口种群的种子重量与利川两种群有极显著差异，但大小却与利川两种群无差异。从萌发实验中得出人工种群种子的相对适合度大致只相当于自然种群的 1/17 和 1/6。尽管产生种子的数量很大，野生水杉的发芽率很低已有报道(张卜阳 2000, 廖绍忠, 周万良 1989, 辛霞等 2004)，但人工水杉与野生水杉相比发芽率更加低。无论是形态特征还是发芽率，水杉人工种群的种子都小于自然种群，表明自然种群的种子质量高。人工水杉种群的幼苗生长过程与自然种群几乎无差异，说明限制人工种群自我更新能力的问题出在种子质量上，种子质量低导致植物的适合度下降(Orellana *et al.* 2005)。火炬松也有类似情况发生，不管产种量大还是小的年份，在种子形成幼苗的过程中效率非常低。但是火炬松有两方面原因，一是出苗率很低，另外一个原因是新生苗的死亡率很高(Pinder *et al.* 1995)。黄山松种子发芽率不高，种子活力低，也是影响其种群繁殖和更新的因素(罗世家, 易咏梅 2000)。种质库——是植物现存个体储存遗传变异的仓库，种质库的优良可揭示物种的遗传潜力(Tanksley & McCouch 1997)，对一个物种的生存至关重要，特别是野生物种。水杉的野生种群保存种质资源优于人工种群，人工种群生存潜力值得置疑。

人工水杉交配系统的异交率比自然种群略高，并且人工种群和自然种群的幼苗生长除高度上汤口种群略有偏低外，其它种群无论从高度，还是基径、冠幅和侧枝数都无差异。基因有“噪音繁殖”的现象(Pedraza & Oudenaarden 2005)，人工水杉种群的繁殖过程存在大量的“噪音繁殖”，大量败育种子的产生不仅浪费植物用于繁殖的资源，还给人以“兴旺”的假象。萌发即是对噪音繁殖的一个强烈选择过程，败育种子经淘汰，只有质量过关的种子才能萌发并生长。种子经选择后，人工水杉种群的幼苗生长与自然种群无差别。大量自交后代死亡或适合度低导致了人工种群表现出高度的异交率。

4.4.2 人工水杉种群的繁殖瓶颈

比较来看，水杉的人工种群尽管数量上远远多于野生水杉，甚至比曾经自然分布的水杉种群范围都大，但人工种群繁殖能力远未达到野生水杉的水平。本研究是在人工环境中提供了良好条件下进行的，种子萌发率较高，水杉自然种群的萌发率(32.85%和 27.78%)高于原产地播种水杉种子的发芽率($12 \pm 3\%$)(张卜阳 2000)，可以想象若是完全天然状态下种子的萌发率还要低很多。本研究中人工种群的种子萌发率为 1.93%和 5.75%，在天然状态下将会更低，这也是为什么尽管许多人工水杉林的年龄已进入繁殖阶段，但未见天然更新的幼苗的主要原因。

正由于种子被当作植物的“遗传资源”(Charles 2001)，所以植物的种质问题是个难题(hot potato)(Stokstad 2002)，水杉人工种群问题也恰恰出在这里。影响人工水杉种群繁殖的瓶颈，

主要在于连接亲本和后代的枢纽——种子质量的好坏。从种子的物理性质和发芽情况，都可反映水杉人工种群与自然种群的差距。在火炬松的繁殖影响因素研究中也得到同样结论，在种子产生、种子发芽、幼苗存活以及幼苗生长一系列环节中，限制火炬松繁殖成功的最重要因素是由种子形成幼苗的概率很低(Pinder *et al.* 1995)。植物繁殖的成功率取决于健康种子的生产状况(Sundaresan 2005)，而且，环境差异的作用相比于植物本身特征(如种子的质量)是微不足道的(Moles *et al.* 2005)。水杉人工种群种子的质量低影响个体后代的适合度，影响整个种群的自我更新能力。因此，水杉人工种群的繁殖正受到严重威胁。

第五章 水杉保护建议

5.1 水杉人工种群的恢复建议

水杉是重要的活化石植物，也是全球性的濒危物种。保护水杉，不仅保护自然种群，迁地保护的新种群也应该建立并且保护(Rogers 2002)，新种群的建立是对野生物种基因的储存方式(Hedrick 1995)。我们的研究显示，尽管水杉在数量上恢复了，在分布上也超过了古代水杉曾经的面积，但是人工种群的遗传结构并没有完全恢复。微卫星对水杉自然种群的遗传结构分析，比我们以前用 RAPD 分析结果(Li *et al.* 2005)更加令人感到保护水杉的紧迫性。无论从种内遗传多样性，还是从种间遗传分化角度，微卫星研究结果更加深入的提示我们水杉种群严重的濒危程度，以及我们加强正确保护措施必要性。同时，对水杉人工种群自我更新能力研究表明，现有水杉人工种群本身具有繁殖瓶颈，并且繁殖环境不利，几乎丧失种群天然更新能力。

种群的恢复不仅是生态环境的恢复，还要恢复种群本身的遗传结构和生存能力。遗传变异在应对环境变化时起了重要的作用。在遗传因素没有影响物种之前，大部分物种都不会趋向灭绝(Spielman *et al.* 2004)。但很少有濒危物种的恢复涉及到遗传结构角度。由于恢复过程未考虑遗传背景，濒危物种莫纳罗亚山的玄参科植物 *Cordylanthus maritimus*(Helenurm & Parsons 1997)和大叶藻(*Zostera marina*)(Williams & Orth 1998)的恢复种群遗传多样性都出现较低后果。所以，对水杉人工种群遗传结构的恢复非常迫切。

同时，对物种保护的遗传途径，要利用自然和种子库中所提供的遗传变异这笔财富(Tanksley & McCouch 1997)。水杉人工种群繁殖的瓶颈是种子质量低，对繁殖力的恢复关键在于提高种子质量，以便恢复水杉人工种群的天然更新能力。

首先，人工水杉种群栽培应考虑合理的密度，以保证提供充足的繁殖力量所需的营养。可利用的资源是生物生长和繁殖的保障。每个生物都只能在生长、存活和繁殖的各种可能组合中寻找一个最佳方案，以最大限度地实现其繁殖成效(张大勇 2004)。植物在有限的资源下，如果分配给生长、存活资源量增加，势必影响到繁殖。如果分配给繁殖的资源量增加，用于存活、生长的减少，也会影响到植物未来的生长与繁殖活动(张大勇 2004)。种群密度对植物产种、结实，进而对后代适合度的影响已有许多报道(Pinder *et al.* 1995, Lazcano *et al.* 1997, Ali & Zaman 1997, Arango *et al.* 1998)。因此，提高人工水杉种群的繁殖，要尽可能地给以人工种植水杉可利用资源，使之自身合理地分配各部分资源利用量，最大限度实现繁殖成效。人工水杉种群栽培过程中，不仅选择合适的生长环境，还要考虑合理的种群密度。

其次，取样时应避免种子来源单一的现象，保持新建种群的遗传多样性。人工水杉种群遗传多样性低于自然种群，引种时存在取样单一的问题，传统林业育种方法一般是从一些“优树”中收集种子。这种方法可能对获得某些特别性状有利，但是不太适合物种遗传特性的恢复。更加适当的方法是种子的收集要考虑遗传背景，并且尽可能地有遗传代表性(Guerrant 1992)，避免仅从一些性状优良、长势良好的“优树”采种。在栖息地破坏非常严重以致短期存活都成问题的种群中，提高种群的遗传多样性尤为重要(Haig 1998)。甚至，在水杉古树数量只有 5 千多株这种数量相当小的种群中，把每个野生个体都取样建立新种群也是可能的(Li *et al.* 2005, McKay *et al.* 2005)。

第三, 取样也要避免种质混杂的问题, 保持新建种群间的遗传分化程度。如上所述, 水杉人工种群的遗传恢复应该适当增加种群的遗传多样性, 避免取样单一, 但也不要种质混杂。在经历了漫长的进化过程后, 不管是由于较弱的基因流(Qiu 2004), 还是遗传漂变(Bucci 1997), 或者是由于特殊的环境原因, 每个种群都会形成自己独立的“特性”, 具有适应当地环境条件的独特基因(McKay *et al.* 2005), 种群间自然有一定程度的遗传分化。为了使异地保护种群尽可能的避免驯化, 保持其原有的遗传特性, 迁地引种时要考虑种群遗传分化的问题, 否则会磨灭种群间的界线, 丢失部分特色基因, 使各个种群基因混杂。尽管种质混杂可以增加恢复种群的遗传多样性, 但这种方法不适合濒危物种新种群的重建(Lesica & Allendorf 1999)。基因型混杂导致恢复种群不能保持野生种群的遗传变异, 并且可能导致远交衰退(Barrett & Kohn 1991, Waser 1993)。植物种群恢复的主要挑战之一是如何达到一种既避免近交衰退, 同时又要阻止远交衰退的平衡状态(McKay *et al.* 2005)。因此, 濒危物种恢复时不仅要适当增加种群的遗传多样性, 还要注意保持各恢复种群间一定的遗传分化程度。人工种群最好有与自然种群相对应的遗传分化格局(李媛媛 2003), 遗传分化程度越大, 该种群越有独立的保护价值(Bucci 1997), 越应该在种群水平上保护物种(Rogers 2002)。

鉴于以上情况, 对水杉野生种群采种时应针对不同种群的种子实行分区管理, 避免不同种群的混杂; 同时, 找到匹配的气候和环境条件地点(McKay *et al.* 2005), 对来自不同种群的种子或种苗实行分区配送, 这样才可以保存原生种群的遗传结构。所以, 每一个自然种群最好有本身类似的多个恢复种群, 尽量避免与其它自然种群种质混合。

5.2 水杉自然种群的保护建议

水杉人工种群遗传结构的不成功恢复, 天然更新能力差, 更加暗示给我们保护水杉自然种群的必要性和迫切性。水杉自然种群自其发现以来就一直得到保护, 但它的生存状况仍然不容乐观(李媛媛 2003, 王希群等 2005)。

1972-1974 年对利川水杉普查时, 共编号原生水杉母树(胸径 20cm 以上)5069 株; 十年后再次普查原生水杉母树为 5746 株; 再过二十年后(2002-2004 年)的调查只剩 5360 株(王希群等 2005)。20 年间水杉古树死亡 386 株, 占 6.72%。水杉古树的径级结构呈倒金字塔型, 为衰退型种群(李媛媛 2003)。原生水杉种群 1980 年时已经没有天然更新的幼苗、幼树, 与 1948 年水杉大树下的灌木丛中存在水杉幼苗的状况截然不同(Bartholomew *et al.* 1999)。群落变化由混交林变为纯林、结构趋于简单、生物多样性减少、天然更新困难(王希群等 2005)。水杉古树病虫害依然存在, 至 2001 年已由 684 株水杉树遭受色卷蛾的危害(文甲举等 2001)。水杉树木与当地居民的房屋非常近, 受人为活动影响强烈(李媛媛 2003)。可见, 水杉自然种群趋于衰退, 面临消失的危险。

鉴于上述水杉自然种群的生存现状, 不仅要对现有水杉自然种群进行较好的保护, 如消灭病虫害, 教育居民避免进行危害水杉树的活动等, 还应人为的帮助其建立适合幼苗生长的生境。为此, 我们提出保护野生水杉的如下两条措施:

(1)退耕还林。洪水冲积下形成的小台地是水杉合适的生境, 但基本上变成了耕地, 种植了以水稻为主的粮食作物, 可将耕地废弃, 供水杉自然更新用。但是, 该项措施将触及当地居民的根本生活来源, 甚至会涉及到移民等问题, 花费巨大资金, 实施有较大难度。

(2)人工辅助下的自然更新措施。水杉为演替前期种类，在自然演替下，以及人为种植其他植物，自然水杉林下郁闭度高，不适合幼苗幼树生长。因此，应禁止人们种植竹子、黄连等植物，并且定期砍伐清理林下灌木丛，形成透光生境，任种子自然散布，为种子萌发、幼苗幼树生长提供合适的环境，从而达到自然更新的目的。

我们对水杉的保护研究表明，濒危物种的恢复不仅仅是数量恢复，遗传结构和天然更新能力也要同时恢复。在考虑濒危物种恢复计划，或者制定濒危物种从红皮书中降级(downlisting)或去除(delistining)标准时，应该考虑遗传信息和更新能力。这是保证恢复种群具有与野生种群相似的遗传变异程度的重要因素(McGlaughlin *et al.* 2002)，也是新种群具有自我维持能力的保证(Pavlik *et al.* 1993)。至于恢复种群与自然种群之间到底需要多大的遗传相似和遗传变异程度，应该具体物种具体分析。

参考文献

- Aizen MA, Feinsinger P (1994) Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest. Argentina. *Ecology*, 75, 330-351.
- Ali MH, Zaman SMH (1997) Dry-matter accumulation, nutrient uptake and seed yield of rapeseed (*Brassica campestris*) as affected by population density and fertilizers. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 67, 23-26.
- Alonso-Blanco C, Vries HB, Hanhart CJ, Koormmeef M (1999) Natural allelic variation at seed size loci relation to other life history traits of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96, 4710-4717.
- Amarasinhe V, Carson JE (2002) The development of microsatellite DNA markers for genetic analysis in Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research*, 32, 1904-1915.
- Anders PJ (2002) Conservation biology of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). A Dissertation for Doctor of Philosophy Degree, University of Idaho.
- Angiosperm phylogeny group (2003) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399-436.
- Arango N, Jacobs BC, Blumenthal MJ (1998) Seed production of *Lotus uliginosus* cv. *sharnae* in response to plant population density. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38, 837-842.
- Arbogast BS, Edwards SV, Wakeley J, Beerli P, Slowinski JB (2002) Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annual Review of Genetics*, 33, 707-740.
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11, 155-165.
- Barrett SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: *Genetics and conservation of rare plants* (eds Falk DA, Holsinger KE), pp:3-30. Oxford University Press, New York.
- Bartholomew B, Boufford DE, Spongberg SA (1999) *Metasequoia glyptostroboides*-Its status in central China in 1980. *Arnoldia, Metasequoia after fifty years*, 58-59, 47-53.
- Bartsch D, Lehnen M, Clegg J, Pohlorf M, Schuphan I, Ellstrand NC (1999) Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Molecular Ecology*, 8, 1733-1741.
- Bateman RM, Crane PR, DiMichele WA, Kenrick PR, Rowe NP, Speck T, Stein WE (1998) Early evolution of land plants: phylogeny, physiology and ecology of the primary terrestrial radiation. *Annual Review of Genetics*, 29, 263-292.
- Baudouin L, Lebrun P (2001) An operational Bayesian approach for the identification of sexually reproduced cross-fertilized populations using molecular markers. *Acta Horticulturae*, 546, 81-94.

- Bechly G (2005) Glossary of Phylogenetic Systematics with a critic of mainstream cladism. Available at <http://www.naturkundemuseum-bw.de/stuttgart/projekte/bernstein/odonata/glossary.htm#monophylum>.
- Blakesley D, Pakkad G, James C, Torre F, Elliott S (2004) Genetic diversity of *Castanopsis acuminatissima* in northern Thailand and the selection of seed trees for forest restoration. *New Forests*, 27, 89-100.
- Boavida LC, Vieira AM, Becker JD, Feijo JA (2005) Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote. *International Journal of Developmental Biology*, 49, 615-632.
- Bouzat JL, Cheng HH, Lewin HA, Westemeier RL, Brawn JD, Paige KN (1998) Genetic evaluation of a demographic bottleneck in the greater prairie chicken. *Conservation Biology*, 12, 836-843.
- Brocchieri L (2001) Phylogenetic inferences from molecular sequences: Review and Critique. *Theoretical Population Biology*, 59, 27-40.
- Brown AHD, Allard RW (1970) Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. *Genetics*, 66, 133-145.
- Brunsfeld SJ, Soltis PS, Soltis DE, Gadek PA, Quinn CJ, Strenge DD, Ranker TA (1994) Phylogenetic relationships among the genera of Taxodiaceae and Cupressaceae: evidence from rbcL sequence. *Systematic Botany*, 19, 253-262.
- Bucci G, Vendramin GG, Lelli L, Vicario F (1997) Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 1138-1146.
- Charles D (2001) Seed of discontent. *Science*, 294, 772-775.
- Chaney RW (1948) Redwoods in China. *Natural History*, 57, 440-444.
- Chen XY, Li YY, Wu TY, Zhang X, Lu HP (2003) Size-class differences in genetic structure of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng (Taxodiaceae) plantations in Shanghai. *Silvae Genetica*, 52, 107-109.
- Gemmill CEC, Ranker TA, Ragone D, Perlman SP, Wood KR (1998) Conservation genetics of the endangered endemic Hawaiian genus *Brighamia* (Campanulaceae). *American Journal of Botany*, 85, 528-539.
- Chu KL, Cooper WS (1950) An ecological reconnaissance in the native home of *Metasequoia Glyptostroboides*. *Ecology*, 31, 260-278.
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2004) Implications of clonal structure for effective population size and genetic drift in a rare terrestrial orchid, *Cremastra appendiculata*. *Conservation Biology*, 18, 1515-1524.
- Clegg MT (1980) Measuring plant mating systems. *BioScience*, 30, 814-818.
- Cohen J (1997) Can cloning help save beleaguered species? *Science*, 276, 1329-1330.
- Colunga-Garciamarin, P, Estrada-Loera, E, May-Pat, F (1996) Patterns of morphological variation,

- diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatan, Mexico. *American Journal of Botany*, 83, 1069-1082.
- Cornuet JM, Piry S, Liukart G, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, 153, 1989-2000.
- Cunningham CW (1997) Can tree incongruence tests predict when data should be combined? *Molecular Biology and Evolution*, 14, 733-740.
- Dobson AP, Bradshaw AD, Baker AJM (1997) Hopes for the future: restoration ecology and conservation biology. *Science*, 277, 515-522.
- Doyle JJ (1993) DNA, Phylogeny, and the flowering of plant systematics. *BioScience*, 43, 380-389.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Dudash MR, Carr DE (1998) Genetics underlying inbreeding depression in *Minulus* with contrasting mating system. *Nature*, 393, 682-684.
- Dyer RJ, Nason JD (2004) Population graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Molecular Ecology*, 13, 1713-1727.
- Doyle JA (1998) Phylogeny of vascular plants. *Annual Review of Genetics*, 29, 567-599.
- Echt CS, Deverno LL, Anzidei M, Vendramin GG (1998) Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology*, 7, 307-316.
- Eckenwalder JE (1976) Re-evaluation of Cupressaceae and Taxodiaceae: a proposed merger. *Madrono*, 23, 237-300.
- Fabiani A, Hoelzel AR, Galimberti F, Muelbert MMC (2003) Long-range paternal gene flow in the southern elephant seal. *Science*, 299, 676.
- Falk DA, Holsinger KE (1991) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York.
- Fan XX, Shen L, Zhang X, Chen XY, Fu CX (2004) Assessing genetic diversity of *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) populations from China by RAPD markers. *Biochemical Genetics*, 42, 269-278.
- Felsenstein J (1982) Numerical methods for inferring evolutionary trees. *The Quarterly Review of Biology*, 57, 379.
- Fenster CB, Galloway LF, Chao L (1997) Epistasis and its consequences for the evolution of natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 12, 282-286.
- Frankel OH, Brown AHD, Burdon J (1995) *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankel OH, Soule ME (1981) *Conservation and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 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, UK.
- Frankham R (2005) Ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. *Heredity*, 95, 183.
- Gadek PA, Alpers DL, Heslewood MM, Quinn CJ (2000) Relationships within Cupressaceae sensu lato: a combined morphological and molecular approach. *American Journal of Botany*, 87, 1044-1057.
- Galeuchet DJ, Perret C, Fischer M (2005) Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculi* L., in a fragmented landscape. *Molecular Ecology*, 14, 991-1000.
- Galloway LF, Fenster CB (2000) Population differentiation in an annual legume: local adaptation. *Evolution*, 54, 1173-1181.
- Gao LZ (2004) Population structure and conservation genetics of wild rice *Oryza rufipogon* (Poaceae): a region-wild perspective from microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 13, 1009-1024.
- Ge S, Zhang DM, Wang HQ, Rao GY (1997) Allozyme variation in *Ophiopogon xylorrhizus*, an extreme endemic species of Yunnan, China. *Conservation Biology*, 11, 562-565.
- Giroux MJ, Shaw J, Barry G, Cobb BG, Green T, Okita T, Hannah LC (1996) A single gene mutation that increases maize seed weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93, 5824-5829.
- Glémin S, Bataillon T, Ronfort J, Mignot A, Olibieri I (2001) Inbreeding depression in small populations of self-incompatible plants. *Genetics*, 159, 1217-1229.
- Gomory D (1992) Effects of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *Forest Ecology and Management* 54: 215-223.
- Goto S, Tsuda Y, Nagafuji K, Uchiyama K, Takahashi Y, Tange T, Ide Y (2004) Genetic make-up and diversity of regenerated *Betula maximowicziana* Regel. sapling populations in scarified patches as revealed by microsatellite analysis. *Forest Ecology and Management*, 203, 273-282.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Updated from Goudet (1995). Available at <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Goudet J (1995) FSTAT (vers.1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- Guerrant EO (1992) Genetic and demographic considerations in the sampling and reintroduction of rare plants. In: *Conservation Biology: the theory and practice of nature conservation, preservation and management* (eds Fiedler PL, Jain SK), pp. 321-344. Chapman & Hall, New York.
- Gugerli F, Sperisen C, Buchler U, Magni F, Geburek T, Jeandroz S, Senn J (2001) Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations

- suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps. *Molecular Ecology*, 10, 1255-1263.
- Gustafson DJ, Gibson DJ, Nickrent DL (2004) Conservation genetics of two co-dominant grass species in an endangered grassland ecosystem. *Journal of Applied Ecology*, 41, 389-397.
- Haig SM (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79, 413-425.
- Hamrick JL (1989) Isozymes and the analyses of genetic structure in plant populations. In: *Isozymes in Plant Biology* (eds Soltis D, Sotis P), pp. 87-105. Discorides Press, Portland, Oregon, USA.
- Hamrick JL, Godt MJW (1989) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 43-63. Sinauer, Sunderland MA.
- Hamrick JL, Linhart YB, Mitton JB (1979) Relationship between life history parameters and allozyme variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10, 173-200.
- Hart JA (1987) A cladistic analysis of conifers: preliminary results. *Journal of the Arnold Arboretum*, 68, 269-307.
- Hayes CN, Winsor JA, Stephenson AG (2005) Environmental variation influences the magnitude of inbreeding depression in *Cucurbita pepo* ssp. *texana* (Cucurbitaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 147-155.
- Hedrick PW, Kalinowski ST (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, 139-162.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, 16, 629-636.
- Hedrick PW (1995) Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conservation Biology*, 9, 996-1007.
- Helenurm K, Parsons LS (1997) Genetic variation and the reintroduction of *Cordylantbus maritimus* ssp. *maritimus* to Sweetwater Marsh, California. *Restoration Ecology*, 5, 236-244.
- Hennig W (1966) *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Champaign, Illinois.
- Henriquez CA (2004) Effects of habitat fragmentation on seed quality of *Lapageria rosea*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77, 177-184.
- He TH, Rao GY, You RL, Ge S, Zhang DM (2000) Genetic diversity of widespread *Ophiopogon intermedius* (Liliaceae s.l.): a comparison with endangered *O. xylorrhizus*. *Biological Conservation*, 96, 253-257.
- Hogbin PM, Peakall R (1999) Evaluation of the conservation of genetic research to the management of endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, 13, 514-522.
- Hollingsworth PM, Dawson IK, Goodall-Copestake WP, Richardson JE, Weber JC, Montes CS, Pennington RT (2005) Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. *Molecular Ecology*, 14, 497-501.
- Holycross AT (2002) Conservation biology of two rattlesnakes *Crotalus willardi obscurus* and

Sistrurus catenatus edwardsii. A Dissertation for Doctor of Philosophy Degree, Arizona State University.

Husband BC, Schemske DW (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, 50, 54-70.

IUCN Overview. Available at <http://www.iucn.org/en/about/>.

IUCN red list (2004) Categories & Criteria (version 3.1). Available at http://www.redlist.org/info/categories_criteria2001.html.

Ishihama F, Ueno S, Tsumura Y, Washitani I (2005) Gene flow and inbreeding depression inferred from finescale genetic structure in an endangered heterostylous perennial, *Primula sieboldii*. *Molecular Ecology*, 14, 983-990.

Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 424-429.

Jones RC, Mckinnon GE, Potts BM, Vaillancourt RE (2005) Genetic diversity and mating system of an endangered tree *Eucalyptus morrisbyi*. *Australian Journal of Botany*, 53, 367-377.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86, 6196-1200.

Kang M, Jiang MX, Huang HW (2005) Genetic diversity in fragmented populations of *Berchemiella wilsonii* var. *pubipetiolata* (Rhamnaceae). *Annals of Botany*, 95, 1145-1151.

Karhu A, Vogl C, Moran GF, Bell JC, Savolainen O (2006) Analysis of microsatellite variation in *Pinus radiata* reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 167-175.

Kearns CA, Inouye DW (1997) Pollinators, flowering plants, and conservation biology. *BioScience*, 47, 297-307.

Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild population. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 230-241.

Kelly BA, Hardy OJ, Bouvet J (2004) Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. *Molecular Ecology*, 13, 1231-1240.

Khan ML, Bhuyan P, Shankar U, Todaria NP (1999) Seed germination and seedling fitness in *Mesua ferrea* L. in relation to fruit size and seed number per fruit. *Acta Oecologica*, 20, 599-606.

Knowles L, Witkowski ETF (2000) Conservation biology of the succulent shrub, *Euphorbia barnardii*, a serpentine endemic of the Northern Province, South Africa. *Austral Ecology*, 25, 241-252.

Kuser JE, Sheely DL, Hendricks DR (1997) Genetic variation in two *ex situ* collections of the rare *Metasequoia glyptostroboides* (Taxodiaceae). *Silvae Genetica*, 46, 258-264.

- Kusumi J, Tsumura Y, Yoshimaru H, Tachida H (2000) Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae sensu stricto based on matk gene, chlL gene, trnL-trnF IGS region, and trnL intron sequences. *American Journal of Botany*, 87, 1480-1488.
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241, 1455-1460.
- Lande R (1994) Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution*, 48, 1460-1469.
- Lazcano CA, Dainello FJ, Pike LM (1997) Quality and marketable yield of baby-style carrots as affected by root size, population density and lines of seed/bed. *Hortscience*, 32, 601.
- Leach BJ, Foale MA, Ashburner GR (2003) Some characteristics of wild and managed coconut palm populations and their environment in the Cocos (Keeling) Islands, Indian Ocean. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50, 627-638.
- Ledig FT (2000) Founder effects and the genetic structure of Coulter pine. *Journal of Heredity*, 91, 307-315.
- Ledig FT, Hodgskiss PD, Johnson DR (2005) Genic diversity, genetic structure, and mating system of Brewer spruce (Pinaceae), a relict of the Arcto-Tertiary forest. *American Journal of Botany*, 92, 1975-1986.
- Lesica P, Allendorf FW (1999) Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match? *Restoration Ecology*, 7, 42-50.
- Li FG, Xia NH (2005) Population structure and genetic diversity of an endangered species, *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46, 155-162.
- Li YY, Chen XY, Zhang X, Wu TY, Lu HP, Cai YW (2005) Genetic differences between wild and artificial populations of *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng (Taxodiaceae): Implications for species recovery. *Conservation Biology*, 19, 224-231.
- Litrico I, Ronfort J, Verlaque R, Thompson JD (2005) Spatial structure of genetic variation and primary succession in the pioneer tree species *Antirhea borbonica* on La Reunion. *Molecular Ecology*, 14, 1575-1584.
- Liu MH, Chen XY Biased genetic structure in ecologically restored populations of *Cyclobalanopsis myrsinaefolia* (Fagaceae): implications for ecological restoration. Submitted to *Restoration Ecology*.
- Liu YF, Wang Y, Huang HW (2006) High interpopulation genetic differentiation and unidirectional linear migration patterns in *Myricaria laxiflora* (Tamaricaceae), an endemic riparian plant in the Three Gorges valley of the Yangtze River. *American Journal of Botany*, 93, 206-215.
- Lopez-Pujol J, Orellana MR, Bosch M, Simon J, Blanche C (2003) Effects of habitat fragmentation on allozyme diversity and conservation status of the coastal sand dune plant *Stachys maritime* (Lamiaceae) in the Iberian Peninsula. *Plant Biology*, 5, 504-512.
- Lu J, Tang T, Tang H, Huang J, Shi S, Wu C (2006) The accumulation of deleterious mutations in rice genomes: a hypothesis on the cost of domestication. *Trends in Genetics*, 22, 126-131.
- Luciano B (2001) Phylogenetic inferences from molecular sequences: review and critique.

Theoretical Population Biology, 59, 27-40.

- Luo M, Bilodeau P, Koltunow A, Dennis ES, Peacock WJ (1999) Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96, 296-301.
- Ma JS (2003) The chronology of the "living fossil" *Metasequoia glyptostroboides* (Taxodiaceae): A Review (1943-2003). *Harvard Papers in Botany*, 8, 9-18.
- Malmberg RL, Held S, Waits A, Mauricio R (2005) Epistasis for Fitness-Related Quantitative Traits in *Arabidopsis thaliana* Grown in the Field and in the Greenhouse. *Genetics*, 171, 2013-2027.
- Mann C (1997) Cashing in on seed banks' novel genes. *Science*, 277, 1042.
- Marquardt PE, Epperson BK (2004) Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology*, 13, 3305-3315.
- McGlaughlin MK, Karoly K, Kaye T (2002) Genetic variation and its relationship to population size in reintroduced populations of pink sand verbena, *Abronia umbellata* subsp. *breviflora* (Nyctaginaceae). *Conservation Genetics*, 3, 411-420.
- McKay JK, Christian CE, Harrison S, Rice KJ (2005) "How local is local?"-A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology*, 13, 432-440.
- McNeely J, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB (1990) *Conserving the world's biological diversity*. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington, DC.
- Miller MP (1997) *Tools for population genetic analyses (TFPGA) v1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular genetic data*. Northern Arizona University, Arizona, USA.
- Moles AT, Ackerly DD, Webb CO, Tweddlel JC, Dickie JB, Pitman AJ, Westoby M (2005) Factors that shape seed mass evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 10540-10544.
- Morgan M, Gifford K, Babij E, Crouse D, Hornaday K, Klee M, Balis-Larsen M (2006) Overcoming challenges to species recovery. *Endangered Species Bulletin*, 16, 4-9.
- Moriguchi Y, Iwata H, Ujino-Ihara T, Yoshimura K, Taira H, Tsymura Y (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 751-758.
- Morris AB, Baucom RS, Cruzan MB (2002) Stratified analysis of the soil seed bank in the cedar glade endemic *Astragalus bibullatus*: Evidence for historical changes in genetic structure. *American Journal of Botany*, 89, 29-36.
- Moyle LC, Stinchcombe JR, Hudgens BR, Morris WF (2002) Conservation genetics in the recovery of endangered animal species: a review of US endangered species recovery plans (1977-1998). *Animal Biodiversity and Conservation*, 26, 85-95.
- Nakatama Y, Yamaguchi H (2002) Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*)

- by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management*, 2, 25-30.
- Nascimento S, Finkeldey R, Gailing O (2005) Experimental verification of microsatellite null alleles in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.): Implications for population genetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 113-119.
- Nei M (1972) Genetics distance between populations. *The American Naturalist*, 106, 283-292.
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 41, 225-233.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nei M (1996) Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annual Review of Genetics*, 30, 371-403.
- Nei M, Kumar S 著, 吕宝忠, 钟扬, 高莉萍等译, (2002) 分子进化与系统发育. 高等教育出版社, 北京.
- Nei M, Tajima F (1983a) Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. *Genetics*, 207-217.
- Nei M, Tajima F, Tatenos Y (1983b) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, 19, 153-170.
- Novick RR, Dick CW, Lemes MR, Navarro C, Caccone A, Bermingham E (2003) Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12, 2885-2893.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143-1155.
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3/2, 93-114.
- Orellana MR, Rovira AM, Blanche C (2005) Pollination and reproductive success in the gynodioecous endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Canadian Journal of Botany*, 83, 183-193.
- Otero-Arnaiz A, Casas A, Bartolo C, Perez-Negron E, Valiente-Banuet A (2003) Evolution of *Polaskia chichi* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacan Valley, central Mexico: reproductive biology. *American Journal of Botany*, 90, 593-602.
- Otero-Arnaiz A, Casas A, Hamrick JL, Cruse-Sanders J (2005) Genetic variation and evolution of *Polaskia chichi* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacan Valley, central Mexico. *Molecular Ecology*, 14, 1603-1611.
- Paetkau D (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4, 347-354.

- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton CC, Fuetest PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79, 361-382.
- Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F (1988) *Practical Isozyme Genetics*. Ellis Horwood Limited, Chichester, UK.
- Pavlik BM, Nickrent DL, Howald AM (1993) The recovery of an endangered plant. I. Creating a new population of *Amsinckia grandiflora*. *Conservation Biology*, 7, 510-526.
- Peakall R, Ebert D, Scott LJ, Meagher PF, Offord CA (2003) Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollemia nobilis* (Araucariaceae). *Molecular Ecology*, 12, 2331-2343.
- Pedraza JM, Oudenaarden A (2005) Noise propagation in gene networks. *Science*, 307, 1965-1969.
- Petit RJ, Mousadik AE, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12, 844-855.
- Pinder JE, Golley FB, Lide RF (1995) Factors affecting limited reproduction by loblolly pine in a large old field. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 122, 306-311.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95, 536-539.
- Polman JE, Michon SG, Militz H, Helmink TF (1999) The wood of *Metasequoia glyptostroboides* (Hu et Cheng) of Dutch origin. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 57, 215-221.
- Price RA, Lowenstein JM (1989) An immunological comparison of the Sciadopityaceae, Taxodiaceae, and Cupressaceae. *Systematic Botany*, 14, 141-149.
- Qiu YX, Hong DY, Fu CX, Cameron KM (2004) Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 583-596.
- Queiroz AD, Donoghue MJ, Kim J (1995) Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26, 657-681.
- Rahman MM, Mwakangwale MG, Hampton JG, Hill MJ (2005) Plant density affects soybean seed quality. *Seed Science and Technology*, 33, 521-525.
- Rajaram S (1998) Comparison in reproductive capacity of wild and cultivated population of *Marsilea* species. *Journal of Phytological Research*, 11, 187-188.
- Rajora OP (1999) Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 954-961.
- Rajora OP, Rahman MH, Dayanandan S, Mosseler A (2001) Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species. *Molecular and General Genetics*, 264, 871-882.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94, 9197-9221.

- Ratnam W, Lee CT, Muhammad N, Boyle TJB (2000) Impact of logging on genetic diversity in humid tropical forests. In: *Forest genetics and sustainability* (eds. Matyas C). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Red List Categories. Available at http://www.redlist.org/info/categories_criteria2001.
- Reinhammar L, Olsson EGA, Srmeland E (2002) Conservation biology of an endangered grassland plant species, *Pseudorchis albida*, with some references to the closely related alpine *P. straminea* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 139, 47-66.
- Ren Y, Liu X, Ge S (2005) Low genetic diversity among populations of the rare Chinese endemic *Kingdonia uniflora* revealed by RAPD analysis. *Israel Journal of Plant Sciences*, 53, 65-73.
- Reusch TBH, Ehlers A, Hammerli A, Worm B (2005) Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 2826-2831.
- Rieseberg LH, Gerber D (1995) Hybridization in the Catalina island mountain mahogany (*Cercoparpus traskiae*): RAPD evidence. *Conservation Biology*, 9, 119-203.
- Ritland K, Jain SK (1981) A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity*, 47, 35-52.
- Ritland K (1990) A series of Fortran computer programs for estimating plant mating systems. *Journal of Heredity*, 81, 236-237.
- Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity*, 88, 221-228.
- Roderic DM (2001) Available at <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.
- Rogers DL (2002) *In situ* genetic conservation of Monterey pine (*Pinus radiata* D. Don): Information and recommendations. *University of California, Davis CA, USA*.
- Rokas A, Williams BL, King N, Carroll SB (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature*, 425, 798-804.
- Roux F, Camilleri C, Giancola S, Brunel D, Reboud X (2005) Epistatic interactions among herbicide resistances in *Arabidopsis thaliana*: the fitness cost of multiresistance. *Genetics*, 171, 1277-1288.
- Rutschmann F (2006) Molecular dating of phylogenetic trees: a brief review of current methods that estimate divergence times. *Diversity and Distributions*, 12, 35-48.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Sanderson MJ, Shaffer HB (2002) Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Annual Review of Genetics*, 33, 49-72.
- Sato T, Isagi Y, Sakio H, Osumi K, Goto S (2006) Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis.

Heredity, 96, 79-84.

- Schlotterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20, 211-215.
- Scotti I, Paglia GP, Magni F, Morgante M (2002) Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. *Theoretical and applied genetics*, 104, 1035-1041.
- Segarra-Moragues JG, Catalan P (2002) Low allozyme variability in the critically endangered *Borderea chouardii* and in its congener *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae), two paleoendemic relicts from the Central Pyrenees. *International Journal of Plant Sciences*, 163, 159-166.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9, 615-629.
- Sethy NJ, Choudhary S, Shokeen B, Bhatia S (2006) Identification of microsatellite markers from *Cicer reticulatum*: molecular variation and phylogenetic analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 347-357.
- Sgorbati S, Labra M, Grugni E, Bracaccia G, Galasso G (2004) A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. *Plant Biology*, 6, 222-230.
- Shaw DV, Kahler AL, Allard RW (1981) A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 78, 1298-1302.
- Song BH, Clauss MJ, Pepper A, Michell-Olds T (2006) Geographic patterns of microsatellite variation in *Boechera stricta*, a close relative of *Arabidopsis*. *Molecular Ecology*, 15, 357-369.
- Sourdis J, Krimbas C (1987) Accuracy of phylogenetic trees estimated from DNA sequence data. *Molecular Biological Evolution*, 1987, 4, 159-166.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factor impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 15261-15264.
- Stefanovic S, Jafer M, Deutsch J, Broutin J, Masselot M (1998) Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequence. *American Journal of Botany*, 85, 688-697.
- Stem C, Margoluis R, Salafsky N, Brown M (2005) Monitoring and evaluation in conservation: a review of trends and approaches. *Conservation Biology*, 19, 295-309.
- Sterling C (1949) Some features in the morphology of *Metasequoia*. *American Journal of Botany*, 36, 461-471.
- Stinchcombe J, Moyle LC, Hudgens BR, Bloch PL, Chinnadurai S, Morris WF (2002) The influence of the academic conservation biology literature on endangered species recovery planning. *Conservation Ecology*, 6.

- Stokstad E (2002) Rescue planned for seed banks. *Science*, 297, 1625-1626.
- Storfer A (1999) Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biological Conservation*, 87, 173-180.
- Sundaresan V (2005) Control of seed size in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 17887-17888.
- Swofford DL (1998) *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony(*and Other Methods), Version 4.0*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tani N, Takahashi T, Ujino-Ihara T, Iwata H, Yoshimura K, Tsumura Y (2004) Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. *Annals of Forest Science*, 61, 569-575.
- Tanksley SD, McCouch SR (1997) Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277, 1063-1066.
- Tinoco A, Casas A, Luna R, Oyama K (2005) Population genetics of *Escontria chiotilla* in wild and silvicultural managed populations in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 525-538.
- The Convention on Biological Diversity. Available at <http://www.biodiv.org/default.shtml>.
- Thomas BR, Macdonald SE, Hicks M, Adams DL, Hodgetts RB (1999) Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: An assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 793-801.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882.
- Tsumura Y, Yoshimura K, Tomaru N, Ohba K (1995) Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 1222-1236.
- Ueno S, Yoshimaru H, Kawahara T, Yamamoto S (2000) Isolation of microsatellite markers in *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* Nakai from an enriched library. *Molecular Ecology*, 9, 1188-1190.
- US Fish and Wildlife Service (2005) Why save endangered species? Available at <http://endangered.fws.gov/>.
- Verdu M, Traveset A (2005) Early emergence enhances plant fitness: a phylogenetically controlled meta-analysis. *Ecology*, 86, 1385-1394.
- Waser NM (1993) Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. In: *Natural history of inbreeding and outbreeding*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Wattana S (2004) Ecology and conservation biology of *Pomatocalpa naevata* JJ Sm. (Orchidaceae). *Natural History Bulletin of the Siam Society*, 52, 201-215.

- Webb CO, Ackerly DD, McPeck MA, Donoghue MJ (2002) Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Genetics*, 33, 475-505.
- Wei X, Wei JQ, Cao HL, Li F, Ye WH (2005) Genetic diversity and differentiation of *Camellia euphlebia* (Theaceae) in Guangxi, China. *Annales Botanici Fennici*, 42, 365-370.
- Weller SG, Sakai AK (1999) Using phylogenetic approaches for the analysis of plant breeding system evolution. *Annual Review of Genetics*, 30, 167-199.
- Weller SG, Sakai AK, Thai DA, Tom J, Rankin AE (2005) Inbreeding depression and heterosis in population of *Schiedea viscosa*, a highly selfing species. *Journal of Evolutionary Biology*, 18, 1434-1444.
- Westemeier RL, Brown JD, Simpson SA, Esker TL, Jansen RW, et al. (1998) Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science*, 282, 1695-1698.
- Williams SL, Davis CA (1996) Population genetic analyses of transplanted eelgrass (*Zostera marina*) reveal reduced genetic diversity in south California. *Restoration Ecology*, 4, 163-180.
- Williams SL, Orth RJ (1998) Genetic diversity and structure of natural and transplanted eelgrass populations in the Chesapeake and Chincoteague Bays. *Estuaries*, 21, 118-128.
- Witkowski ETF, Dahlmann LA, Boycott RC (2001) Conservation biology of *Kniphofia umbrina*, a critically endangered Swaziland serpentine endemic. *South African Journal of Science*, 97, 609-616.
- Wolf YI, Rogozin IB, Grishin NV, Koonin EV (2002) Genome trees and the tree of life. *Trends in Genetics*, 18, 472-479.
- Workman J (2005) Linking people moving in unison throughout society. In: *Forging Linkages an Assessment of Progress 2004* (eds Workman J), pp. 55. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Wroblewska A, Brzosko E, Czarnecka B, Nowosielski J (2003) High levels of genetic diversity in populations of *Iris aphylla* L. (Iridaceae), an endangered species in Poland. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 142, 65-72.
- Zaghloul MS, Hamrick JL, Moustafa AA, Kamel WM, El-Ghareeb R (2006) Genetic diversity within and among sinai populations of three *Ballota* species (Lamiaceae). *Journal of Heredity*, 97, 45-54.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16.
- Zhang ZY, Chen YY, Li DZ (2005) Detection of low genetic variation in a critically endangered Chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers. *Biochemical Genetics*, 43, 239-249.
- Zuckerkandl E, Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving Genes and Proteins* (eds Bryson V, Vogel HJ), pp. 97-166. Academic Press, New York.

- 陈德平 (1995) 水杉病虫害种类的调查及防治. 江苏林业科技, 22, 40-41.
- 陈小勇 (2004) 交配系统. 植物生活史进化与繁殖生态学(张大勇主编). 科学出版社, 北京.
- 陈小勇 (2000a) 生态恢复过程中的种群遗传学考虑. 长江流域资源与环境, 9, 313-319.
- 陈小勇 (2000b) 生境片段化对植物种群遗传结构的影响及植物遗传多样性保护. 生态学报, 20, 884-892.
- 陈小勇, 厉宁, 沈浪 (2001) 浙江天童国家森林公园红凉伞交配系统研究. 植物生态学报, 25, 161-165.
- 陈小勇, 林鹏 (2002) 厦门木麻黄种群交配系统及近交衰退. 应用生态学报, 13, 1377-1380.
- 陈小勇, 宋永昌 (1997) 黄山钓桥青冈种群的交配系统与近交衰退. 生态学报, 17, 462-468.
- 方德年, 江国治, 方卫华, 韩长顺 (2002) 黄山水杉生长的初步研究. 安徽林业科技, 3, 2-3.
- 方升佐, 徐锡增, 唐罗中 (1995) 水杉人工林树冠结构及生物生产力的研究. 应用生态学报, 6, 225-230.
- 葛菁萍, 林鹏 (2001) 红树植物木榄(*Bruguiera gymorrhiza*)种群的交配系统. 植物生态学报, 25, 50-56.
- 葛颂, 洪德元 (1994) 遗传多样性及其检测方法. 生物多样性研究的理论与方法(钱迎倩, 马克平主编). 中国科学技术出版社, 北京.
- 郭宏伟, 梁俊波, 金会军 (2002) 水杉北方扦插育苗实验. 辽宁林业科技, 3, 42-43.
- 何田华, 葛颂 (2001) 植物种群交配系统、亲本分析以及基因流动研究. 植物生态学报, 25, 144-154.
- 胡先骕, 郑万钧 (1948) 水杉新科及生存之水杉新种, 静生汇报, 1, 16-161.
- 洪菊生 (1994) 杉木种源区划分的研究. 林业科学研究, 17, 130-144.
- 赖焕林, 王明庥 (1997) 马尾松人工群体交配系统研究. 林业科学, 33, 220-224.
- 李春香, 杨群 (2003) 杉科、柏科的系统发生分析——来自 28S rDNA 序列分析的证据. 遗传, 25, 177-180.
- 李春香, 杨群 (2002) 杉科、柏科的系统发生关系研究进展. 生命科学研究, 6, 56-60.
- 李春香, 杨群, 周建平 (1999) 水杉自然居群遗传多样性 RAPD 研究. 中山大学学报(自然科学版), 8, 60-62.
- 李林初 (1989) 杉科的细胞分类学和系统演化研究, 云南植物研究, 11, 113-131.
- 李林初 (1990) 水杉(属)系统位置的研究, 武汉植物学研究, 8, 179-182.
- 李书靖, 王红梅, 何虎林, 王芳, 孟少童 (2000) 侧柏产种量及结实规律研究. 甘肃林业科技, 25, 4-8.
- 李晓东, 黄宏文, 李建强 (2003) 孑遗植物水杉的遗传多样性研究. 生物多样性, 11, 100-108.
- 李晓东, 杨佳, 史全芬, 李建强 (2005) 8 个栽培水杉居群遗传多样性的等位酶分析. 生物多样性, 13, 97-104.
- 李媛媛 (2003) 水杉种群数量和遗传结构研究, 华东师范大学硕士学位论文.
- 李志辉, 何立新, 周育平, 周七昆 (1996) 水杉人工林生物产量及生产力的研究. 中南林学院学报, 16, 47-51.
- 李作洲, (2003) 水杉孑遗居群 AFLP 遗传变异的分布. 生物多样性, 11, 265-275.

- 廖绍忠, 周万良 (1989) 水杉种子发芽条件实验. 四川林业科技, 10, 71-74.
- 刘艳菊, 李承森, 王宇飞 (2003) 中国古植物学研究进展(活化石植物——水杉). 植物学报(增刊), 45, 59—63.
- 刘艳菊, 李承森, 王宇飞 (1996) 水杉属研究述评. 植物学通报, 13, 15-22.
- 罗世家, 易咏梅 (2000) 黄山松种子发芽率及活力的测定. 湖北民族学院学报(自然科学版), 18, 27-29.
- 马常耕, 程长元 (1992) 水杉的无性系选育. 林业科学研究, 5, 506-511.
- 马金双 (2003) 水杉发现大事记——六十年的回顾. 植物, 3, 37-40.
- 马清温, 张金保 (2003) 水杉(杉科)的叶表皮结构. 植物研究, 23, 32-36.
- 史全芬, 杨佳, 李晓东, 李新伟, 李建强 (2005) 水杉栽培居群的遗传多样性研究. 云南植物研究, 27, 403-412.
- 施苏华, 杜雅青, David Bufford, 龚洵, 黄椰林, 何航航, 钟扬 (2003) 用 cpDNA matK 基因和 nrDNA ITS 区序列确定我国特有植物四棱草属的系统位置. 科学通报, 48, 1176-1180.
- 宋永昌 (1997) 生态恢复是生态科学的最终实验——关于恢复生态学的研究. 中国生态学会通讯, 3, 4-5.
- 宋志平, 陈家宽 (1994) 野生稻濒危机制与保育策略. 生物多样性研究的理论与方法(钱迎倩, 马克平主编). 中国科学技术出版社, 北京.
- 宿兵, 施立明, 何光昕 (1994) 大熊猫遗传多样性的蛋白电泳研究. 科学通报, 39, 742-745.
- 文甲举, 吴彬, 李易禄, 范深厚 (2001) 水杉原生古树保护工作现状及存在的问题. 林业科技通讯, 3, 30-31.
- 席以珍 (1988) 水杉花粉外壁超微结构的观察. 植物学报, 30, 644-649.
- 徐炳声, 方永鑫 (1986) 德昌杉木和米德杉木的胞核学研究. 植物学报, 28, 150-155.
- 王德银, 刘和林 (1982) 杉木属新种及新变种. 植物分类学报, 20, 230-232.
- 王定胜 (2002) 水杉播种育苗. 林业实用技术, 6, 26.
- 王伏雄, 钱南芬 (1964) 水杉的胚胎发育. 植物学报, 12, 241-262.
- 王鸣凤, 王长辉, 许冬芳, 许道林 (2002) 水杉盖膜扦插育苗. 育苗技术, 10, 29.
- 汪松, 解焱主编 (2004) 中国物种红色名录. 高等教育出版社, 北京.
- 王希群 (1994) 水杉种子的生产途径. 种子, 69, 41.
- 王希群, 马履一, 田华, 郭保香 (2005) 中国水杉引种研究. 广西植物, 25, 40-47.
- 汪小凡, 陈家宽 (1999) 矮慈姑的传粉机制与交配系统. 云南植物研究, 21, 225-231.
- 辛霞, 景新明, 孙红梅, 林坚, 汪晓峰 (2004) 孑遗植物水杉种子萌发的生理生态特性研究. 生物多样性, 12, 572-577.
- 尤勇 (1998) 应用 RAPD 标记对杉木属两个种遗传多态性的研究. 聊城师院学报(自然科学版), 11, 72-74.
- 虞沐奎 (1994) 水杉生长与环境关系条件的研究. 安徽林业科技, 1, 23-25.
- 于永福 (1994) 杉科植物分类学研究. 植物研究, 14, 369-382.
- 于永福 (1995) 杉科植物的起源、演化及其分布. 植物分类学报, 33, 362-389.

- 于永福, 傅立国 (1996) 杉科植物的系统发育分析. 植物分类学报, 34, 124-141.
- 张卜阳 (2000) 活化石水杉. 北京: 中国林业出版社.
- 张卜阳, 张丰云 (1980) 水杉开花结实发育过程的初步研究. 湖北林业科技, 4, 6-10.
- 张大勇 (2004) 植物繁殖生态学. 植物生活史进化与繁殖生态学(张大勇主编). 科学出版社, 北京.
- 张大勇, 姜新华 (2001) 植物交配系统的进化、资源分配对策与遗传多样性. 植物生态学报, 25, 130-143.
- 张素舫, 崔泽军 (1997) 水杉北方扦插育苗技术初报. 辽宁林业科技, 2, 14-15.
- 张志勇, 葛颂 (2005) 物种濒危的遗传学原理. 物种濒危机制和保育原理(李典谟, 徐汝梅主编). 科学出版社, 北京.
- 郑万钧, 傅立国 (1978) 中国植物志第七卷. 284-289. 科学出版社, 北京.