



• 研究报告 •

基于保护基因组学揭示荷叶铁线蕨的濒危机制

孙维悦^{1,2}, 舒江平^{2,3}, 顾钰峰^{1,4}, 莫日根高娃⁴, 杜夏瑾², 刘保东^{1*}, 严岳鸿^{2*}

1. 哈尔滨师范大学植物生物学黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150025; 2. 深圳市兰科植物保护研究中心, 广东深圳 518114; 3. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 4. 中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海 201602

摘要: 理解物种的濒危机制对生物多样性的科学保护至关重要。荷叶铁线蕨(*Adiantum nelumboides*)作为国家一级重点保护野生植物, 其遗传多样性状况和濒危机制一直存在较大争议。本文利用简化基因组测序技术(genotyping by sequencing, GBS)对来自6个居群的28个荷叶铁线蕨样本测序, 共获得29.6 Gb的数据, 并筛选得到9,423个高质量单核苷酸变异位点(SNP), 通过遗传多样性和居群遗传结构分析, 并结合不同气候情景下物种潜在分布区差异, 探讨了荷叶铁线蕨的濒危原因和科学保护策略。结果表明: (1)荷叶铁线蕨具有较低的遗传多样性($H_o = 0.138$, $H_e = 0.232$, $P_i = 0.373$), 同时种群间具有较低的遗传分化($F_{st} = 0.0202$)和基因流($N_m = 1.9613$); (2)所有样本均来自2个遗传分组, 基因组大小为 5.01–5.83 Gb, 且均为四倍体, GC含量约为 39%–41%; (3)生态位模拟表明, 与现代气候相比, 在未来气候变化下荷叶铁线蕨的潜在分布区面积略有增加, 但高适生区面积减小。其主要适生区向北迁移, 影响其分布的主导因子为昼夜温差月均值和最冷季降水量。正是由于荷叶铁线蕨遗传多样性低, 不同种群间遗传分化较低, 再加上气候条件的变化, 其适生区狭窄, 导致其遗传多样性和种群数量急剧下降。因此, 自身更新能力低以及过度的人为活动干扰可能是导致其濒危的主要原因。建议加强对荷叶铁线蕨的就地保护; 通过生境恢复及自然回归等措施, 增加居群间的基因交流, 防止遗传资源丢失加剧。

关键词: 遗传结构; 物种分布模型; 主导气候因子; 遗传多样性; 简化基因组测序

孙维悦, 舒江平, 顾钰峰, 莫日根高娃, 杜夏瑾, 刘保东, 严岳鸿 (2022) 基于保护基因组学揭示荷叶铁线蕨的濒危机制. 生物多样性, 30, 21508. doi: 10.17520/biods.2021508.

Sun WY, Shu JP, Gu YF, Morigengaowa, Du XJ, Liu BD, Yan YH (2022) Conservation genomics analysis revealed the endangered mechanism of *Adiantum nelumboides*. Biodiversity Science, 30, 21508. doi: 10.17520/biods.2021508.

Conservation genomics analysis revealed the endangered mechanism of *Adiantum nelumboides*

Weiyue Sun^{1,2}, Jiangping Shu^{2,3}, Yufeng Gu^{1,4}, Morigengaowa⁴, Xiajin Du², Baodong Liu^{1*}, Yuehong Yan^{2*}

1 Key Laboratory of Plant Biology, College of Heilongjiang Province, Harbin Normal University, Harbin 150025

2 The Orchid Conservation and Research Centre of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518114

3 South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650

4 Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201602

ABSTRACT

Aims: Understanding the mechanism that leads species to endangerment is crucial to the conservation of biodiversity. *Adiantum nelumboides* is a key wild plant that is protected at the national level, and its genetic diversity and endangerment mechanism are controversial.

Methods: A total of 28 *A. nelumboides* samples, from six populations, were used to obtain single-nucleotide variation sites (SNP) by the genotyping by sequencing (GBS) method. The genetic diversity and structure of the population were analyzed and combined with the change in the potential distribution area of species under different climate scenarios. Then the possible causes of endangerment and scientific protection strategies of *A. nelumboides* were discussed.

Results: The results showed that 29.6 Gb of data was obtained based on the GBS sequencing, and 9,423 high-quality SNP loci were screened. *Adiantum nelumboides* had low genetic diversity ($H_o = 0.138$, $H_e = 0.232$, $P_i = 0.373$), low

收稿日期: 2021-12-09; 接受日期: 2022-04-09

基金项目: 生态环境部生物多样性调查与评估项目(2019HJ2096001006)

* 共同通讯作者 Co-authors for correspondence. E-mail: yhyan@sibs.ac.cn; 99bd@163.com

genetic differentiation ($F_{st} = 0.0202$) and gene flow ($N_m = 1.9613$). The *A. nelumboides* samples are from two ancestral haplotypes, their genome size was 5.01–5.83 Gb, they were tetraploid, and the GC content was about 39%–41%. Under future climate change, the potential distribution area of *A. nelumboides* will increase slightly, in which the area of high fitness is lost. The primary areas that are suitable for the plant are distributed in Wanzhou, Chongqing and further north. The dominant factors affecting its distribution are monthly mean differences in diurnal temperatures and precipitation during the coldest season.

Conclusions: Due to the low genetic diversity, lack of gene exchange between different populations, and changes in climatic conditions, suitable growth areas for *A. nelumboides* become narrow, resulting in a sharp decline in species diversity and population size. Therefore, their low regeneration ability and excessive disturbance from human activities might be the main reasons for the endangered status of *A. nelumboides*. It was recommended to strengthen *in situ* conservation of *A. nelumboides*. Measures such as habitat restoration and natural regression must be discussed to increase gene exchange across populations. At the same time, a core germplasm of this species must be constructed to prevent the aggravation of genetic resource loss.

Key words: genetic structure; species distribution models; dominant climate factor; genetic diversity; genotyping-by-sequencing

物种的遗传多样性是指同一物种不同个体之间以及不同物种之间所存在的遗传差异程度(马克平和钱迎倩, 1998)。它既是生物多样性的的重要组成部分, 也是物种多样性、谱系多样性、功能多样性、生态系统多样性等其他多样性层次或维度的重要基础(Cires et al, 2011)。遗传多样性是物种生存和进化的基石(Reid et al, 1993), 一般来说, 植物遗传变异的大小与其未来命运和进化潜力密切相关(刘张璐, 2010)。遗传多样性高的物种或群体更容易适应外界快速变化的环境, 从而更能应对不良环境的选择压力, 具有更高的进化潜力(Solomon et al, 2019); 遗传多样性水平低的物种或自然群体适应外界自然环境变化的能力就会越低, 有时甚至会趋向灭绝(Hueneke, 1991)。为什么低遗传多样性的物种或自然群体会趋向灭绝? 以往人们只是将原因简单地归咎于物种本身的进化历史和遗传结构。

近年来, 随着分子生物学特别是高通量测序技术的发展, 人们可以从基因组层面更深入地了解物种的遗传结构和进化历史, 利用大量的分子标记构建物种间相对稳健、可信的亲缘关系(Fu et al, 2014)。基因分型测序技术(genotyping by sequencing, GBS)可以捕获大量全基因组水平的单核苷酸多态性(SNP)位点, 具有低成本、耗时短及高通量开发非模式物种的SNP分子标记等优点(Miller et al, 2007)。因此, 越来越多的研究者利用该技术开展保护遗传学、分子育种、性状图谱构建、优质种质资源遗传多样性分析等研究(Pegadaraju et al, 2013)。荷叶铁线蕨(*Adiantum nelumboides*)分布于我国长江

三峡地区。该种外形独特, 最早被处理为原产非洲东部地区的肾叶铁线蕨的变种(*A. reniforme* var. *sinensis*)。近年来分子系统学、细胞学及形态学等研究结果表明该物种是和肾叶铁线蕨(六倍体)亲缘关系紧密的四倍体(Wang et al, 2015), 并被提升为独立物种。由于三峡工程的建设, 荷叶铁线蕨部分生境被淹没; 再加上具有较高的观赏价值和药用价值(陈绍成, 2014), 因此生态环境的破坏和人工采挖可能是导致其数量迅速减少、分布范围急剧狭缩的主要因素(Wu et al, 2003)。目前, 该物种正处于灭绝的边缘, 《国家重点保护野生植物名录》(2021版)(<https://www.forestry.gov.cn/main/3954/20210908/163949170374051.html>)和《中国植物红皮书》(傅立国和金黎明, 1991)分别将其列为国家一级和二级保护。同时, 世界自然保护联盟(International Conservation Union, IUCN)的濒危物种红色名录将其列为极危(Critically Endangered)。

荷叶铁线蕨的遗传多样性研究一直存在争议。基于基因组随机扩增多态性DNA标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)的研究结果显示, 荷叶铁线蕨的居群内部和居群间均存在遗传分化, 其遗传多样性相关指数中等偏下, 居群之间存在一定的基因流; 但等位酶标记的研究结果表明, 荷叶铁线蕨居群内的遗传多样性和居群间的遗传分化水平比其他蕨类植物低(潘丽芹等, 2005)。然而, 无论遗传多样性高低, 荷叶铁线蕨的濒危原因均指向三峡地区严重的环境破坏和野生群体的过度开发利用(黄至欢, 2020)。因此, 我们认为应从该物种

自身的全基因组水平遗传变异及分布格局、群体进化历史等方面探讨荷叶铁线蕨的濒危机制。

本研究在长江三峡地区采集6个居群共28个荷叶铁线蕨样本, 进行基因组大小测定和简化基因组测序。旨在探明以下内容: (1)荷叶铁线蕨的基因组大小是否存在种群间的变异? (2)荷叶铁线蕨基因组的GC含量及基因组结构的稳定性; (3)荷叶铁线蕨居群内部及居群间的遗传多样性大小; (4)荷叶铁线蕨的群体遗传结构及种群间基因流水平; (5)荷叶铁线蕨的种群动态历史; (6)通过模拟不同气候情景下的潜在分布区变化来拟合荷叶铁线蕨的遗传多样性与种群历史和未来动态的一致性, 从而更深入地探讨荷叶铁线蕨可能的濒危原因, 为荷叶铁线蕨的保护提供科学依据。荷叶铁线蕨作为中国生物多样性保护中的旗舰物种, 其保护基因组学分析有助于更深入地理解当前日益增加的濒危物种的保护机制。

1 材料和方法

1.1 植物材料

共有采自重庆市6个样点的28份试验材料, 基本覆盖了该植物的分布区, 样品按区域分布分组(表1), 每个样品取完整的叶片用硅胶干燥、备用, 凭证标本存放于上海辰山植物园植物标本室(CSH)。

1.2 DNA提取和GBS文库构建

采用改良的CTAB法提取DNA, 使用植物基因组DNA快速提取试剂盒(Biomed基因技术)从样品中分离总DNA。将通过琼脂糖凝胶电泳质量检测的样本送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进

行限制性酶切位点关联DNA建库测序。取Mse I和Ecor I限制性内切酶进行酶切, 之后在片段两端加接头, PCR扩增含有接头的tag序列, 将样品混合后通过电泳回收DNA条带, 纯化后的产物在Illumina HiSeq测序平台上进行双末端150测序。

1.3 获取单核苷酸多态性(SNP)

依据建库样品对应关系拆分为单样品原始数据, 将下机测序得到的原始数据raw reads使用FastQC v 0.11.9软件进行质控, 去除测序接头以及引物序列; 切除质量值低于20的碱基。以荷叶铁线蕨全基因组作为参考, 利用BWA v 0.7.17比对软件(Li & Durbin, 2010)将样品过滤后的有效数据(clean reads)与参考基因组进行比对。使用Samtools v 1.14软件加头, 去重复。运行GATK v 4.0进行变异检测, 即CALL SNP。将个体样本变异位点和基因型信息提取生成vcf格式文件来获得SNP标记。

通过进一步过滤筛选, 提高准确度。运行GATK软件使用参数“QD < 2.0 || FS > 60.0 || MQ < 40.0 || MQRankSum < -12.5 || ReadPosRankSum < -8.0”对vcf格式文件初步过滤, 得到包含26,578个SNP位点的vcf文件。使用vcftools v.4.1软件对获得SNP分型结果进行过滤, 主要参数--maf 0.01 --minDP 4 --max-missing 0.8; 再进一步利用Plink v1.90软件进行哈迪温伯格平衡(HWE)和连锁不平衡(LD)过滤, 按 $P < 0.001$, $r^2 < 0.01$ 进行过滤; 过滤后剩下的高质量SNP用于群体遗传结构分析。

1.4 群体结构分析

用ADMIXTURE v1.3.0软件基于每个个体的基因型推断个体祖先成分, 对经过miss 0.4、maf 0.05

表1 荷叶铁线蕨样品采集信息

Table 1 Sample details of *Adiantum nelumboides*

居群 Population	采样地点 Sampling localities	样本数量 Sample size	样本采集号 Voucher no.
石柱 SZ	重庆市石柱县西沱镇 Xituo Town, Shizhu County, Chongqing	10	YYH15105, YYH15106, YYH15107, YYH15108, YYH15109, YYH15110, YYH15111, YYH15112, YYH15113, YYH15116
南川 NC	重庆市南川区 Nanchuan District, Chongqing	3	YSR0101, YSR0201, YSR0204
新乡 XX	重庆市万州区新乡镇 Xinxiang Town, Wanzhou District, Chongqing	8	YYH15091, YYH15071, YYH15072, YYH15088, YYH15087, YYH15092, YYH15090, YYH15086
燕山 YS	重庆市万州区燕山乡 Yanshan Town, Wanzhou District, Chongqing	1	YYH15070
武陵 WL	重庆市万州区武陵镇 Wuling Town, Wanzhou District, Chongqing	5	YYH15117, YYH15118, YYH15119, YYH15120, YYH15121
忠县 ZX	重庆市忠县石宝镇 Shibao Town, Zhong County, Chongqing	1	YYH15114

过滤条件筛选后得到的SNP位点进行聚类分析, 参数设置为 $K = 1-10$, 每个 K 值重复10次运算, 运行代数为1,000,000, 舍弃前500,000代, 用最小交叉验证(cross validation, CV)错误值判断最佳 K 值。具体运行参数为admixture --cv out.recode.bed \$K | tee log \${K}.out, 最终用R软件的ggplot2软件包绘制结果图。

用PGDspider2将获得的SNP数据转换为构建系统发育树的文件, 在IQ-TREE v1.7中根据最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统树, 最后使用FigTree v1.4.4对系统发育树进行可视化。同时, 在Plink中用PCA揭示群体结构并计算各主成分解释率。遗传结构分析均使用去除LD位点的SNP数据集, 在R中的ggplot2软件包绘制结果图。

1.5 遗传多样性分析

通过Stacks v2.41软件中的Populations子程序计算种间遗传分化系数(genetic differentiation, F_{st})、物种水平的近交系数(inbreeding coefficient, F_{is})、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)和期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)及个体水平的 H_o 。同时基于所有(变异和非变异)位点计算核苷酸多态性(nucleotide diversity, π)和基因交流情况计算基因流(N_m)等遗传参数。

1.6 基因组大小估算

以玉米为内参, 基因组大小为2.3 Gb, 以嫩叶为试验材料, 待测样品DNA含量 = 内参DNA含量 \times 待测样品的荧光强度/内参样品的荧光强度。待测样品的倍性 = 已知品种的倍性(田新民等, 2011)。

1.7 有效种群大小波动历史分析

将获得的SNP数据使用Stairway Plot v2推测荷叶铁线蕨在一千万年前到1 kya (thousand years ago, kya)间的群体的有效大小 N_e 变化。生成无缺失且无LD的SNP数据集, 将vcf文件用python脚本easySFS (https://github.com/isaacovercast/easySFS) 建立一维SFS。将SFS状态指定为folded, 以统计次等位基因的SFS。选择位点数尽量多的projection值输出SFS信息, 将SFS信息输入Stairway Plot运行所需的blueprint文件中。突变率设置为 1.0×10^{-8} /位点/代, 40年为一代(IUCN, 2010), 200次自展用于计算 N_e 中位数及95%置信区间。结果在R软件中可视化。

1.8 潜在分布区预测

根据材料采集和种质资源调查, 通过GPS实地

定位获得分布点经纬度信息, 通过中国数字植物标本馆(http://www.cvh.org.cn/)获取标本采集地经纬度信息, 共收集荷叶铁线蕨坐标信息25个, 保存为Excel文件再转化为CSV格式用于分布预测建模使用。选取现代和未来(2080年)的19个生物气候变量, 气候数据下载于世界气候数据库 WorldClim (http://worldclim.org)。该数据属于XYZ插值数据, 数据空间分辨率为2.5'。选取末次盛冰期(last glacial maximum, LGM)和末次间冰期的群落气候系统模型, 以及RCP 2.6温室气体排放情景。数据经ArcGIS 10.6软件剪裁为中国范围并转换为ASCII格式。

运行MaxEnt v 3.4.1软件(http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent)模拟荷叶铁线蕨在不同气候情景下的潜在分布格局, 设置训练集为75%、测试集为25%进行模拟分析。将物种分布数据与气候环境数据一起导入MaxEnt中, 选择刀切法(Jackknife)绘制响应曲线并制作预测图。加载到ArcGIS v 10.8中, 按照“自然间断点分级法”(natural break)将中国区域划分为4个不同综合评价等级: 非适生区; 一般适宜区; 较适宜区; 最适宜区。采用ROC曲线来评价模型预测结果的精准度, 环境变量的贡献率判断影响物种分布的主导环境因子。

2 结果

2.1 SNP位点数与GC含量统计

对28份荷叶铁线蕨样品进行测序得到高质量序列数据共29.6 Gb, 平均每样本1.06 Gb, GC含量为39%–41% (附录1)。其中石柱群体的平均GC含量最高, 为40.81%; 南川群体最低, 为39.7%, 各群体间GC含量差异并不显著。所有的序列均通过质量阈值, 可以用于GBS文库的构建。测序样品Q30 > 88.97%, 选择荷叶铁线蕨基因组作为参考序列, 28个样本的序列利用BWA软件分别与参考序列进行比对。共观察到11,767个原始SNPs, 剔除了缺失5%以上的SNPs, 获得了9,423个高质量的SNPs, 用于群体遗传数据挖掘和分析。

2.2 基因组大小估测与染色体倍性分析

由表2可知, 内参与待测样品峰值完全分开, 无重叠峰, 峰型清晰集中, 待测样品均为四倍体。根据内参与待测样品的荧光强度, 待测荷叶铁线蕨的基因组大小相近, 基因组大小在5.01–5.83 Gb之间。

2.3 遗传多样性与遗传分化水平估算

对6个地理群体的遗传多样性信息进行统计分析(表3), 结果表明, 28份材料的平均观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和核苷酸多样性(P_i)分别为0.138、0.232和0.373, 新乡居群的杂合度略高于其他居群。除武陵居群外, 期望杂合度均高于观测杂合度, 说明荷叶铁线蕨的分布面积减少、生境破碎化。核苷酸多样性(P_i)分析表明, 南川居群的核苷酸多样性高达0.683, 石柱居群、燕山居群、武陵居群和新乡居群 P_i 分别为0.316、0.117、0.54和0.48。 P_i 值越接近1, 说明该类群的核苷酸多样性越丰富, 适应环境的能力越强。由表4看出, 每个居群的近交系数(F_{is})都大于0, 范围介于0–0.303之间, 其平均值为0.143, 所有居群的近交系数都表现为显著的正值, 表明这些居群存在杂合子不足现象。

荷叶铁线蕨群体间遗传分化系数(F_{st})的变化范围为0.0148–0.0312, 平均值为0.0202 (表4), 表明群体间遗传分化处于较低水平。遗传结构分析表明, 荷叶铁线蕨群体间的遗传变异占2.02%, 遗传变异主要发生在居群内(97.98%)。种群间基因流(N_m)为1.108–2.482, 平均值1.9613, 大于1 (表4), 表明居群

表2 荷叶铁线蕨相对荧光强度
Table 2 Relative fluorescence intensity of *Adiantum nelumboides*

样品 Sample	倍性 Ploidy level	内参荧光强度 Relative fluorescence intensity	待测荧光强度 Mean	基因组大小 Genome size
YYH15105	4X	62.96	151.86	5.55
YYH15111	4X	60.30	140.32	5.35
YYH15112	4X	60.06	130.77	5.01
YYH15116	4X	67.82	171.92	5.83

表3 不同居群荷叶铁线蕨遗传多样性。样品信息同表1。
Table 3 Genetic diversity indices of different groups of *Adiantum nelumboides*. The sample information see Table 1.

居群名称 Population	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	核苷酸多样性 P_i	近交系数 F_{is}
石柱 SZ	0.206	0.214	0.316	0.172
南川 NC	0.211	0.287	0.683	0.27
新乡 XX	0.104	0.285	0.1166	0
燕山 YS	0.106	0.135	0.105	0
武陵 WL	0.198	0.187	0.54	0.117
忠县 ZX	0.218	0.286	0.48	0.303
平均值 Average	0.173	0.232	0.373	0.143

H_o , Observed heterozygosity; H_e , Expected heterozygosity; π , Nucleotide diversity; F_{is} , Inbreeding coefficient.

表4 荷叶铁线蕨居群间的遗传分化系数(F_{st} : 对角线下)与基因流(N_m : 对角线上), 样品信息同表1。

Table 4 Genetic differentiation coefficient (F_{st} : below the diagonal) and gene flow (N_m : above the diagonal). The sample information is shown in Table 1.

居群 Population	石柱 SZ	南川 NC	燕山 YS	忠县 ZX	武陵 WL	新乡 XX
石柱 SZ		1.108	1.957	2.023	2.486	2.157
南川 NC	0.0216		1.795	2.417	2.186	1.957
燕山 YS	0.0194	0.0312		1.864	2.167	2.035
忠县 ZX	0.0165	0.0216	0.0183		2.341	1.628
武陵 WL	0.0186	0.0298	0.0161	0.0176		1.439
新乡 XX	0.0154	0.0251	0.0148	0.0193	0.0169	

间存在一定程度的基因流, 抵消了由遗传漂变导致的群体间遗传分化。遗传距离最远的为南川居群与燕山居群($F_{st} = 0.0312$), 同时燕山和南川的地理距离最远, 表明地理距离和遗传距离具有相关性。

2.4 群体遗传结构分析

基于9,423个核SNP位点进行Structure分析, 结果如图1A所示。当K = 2时, CV值最小, 将供试材料划分为2个遗传分组, 石柱居群、忠县居群、南川居群、燕山居群和新乡居群聚为一个遗传分组, 而武陵居群单独聚为另一个遗传分组; 两个遗传分组之间的分化时间可能较早。同时发现, 两个遗传分组之间存在着一定程度的基因交流或遗传渐渗, 尤其是南川居群和新乡居群中存在一定比例的分组间共享遗传变异。

利用最大似然法(ML)基于9,423个SNP位点对28个样本构建的系统进化树显示(图1A), 28个荷叶铁线蕨样本聚类成2个大的遗传分支。除YSR0201和YYH15070样品外其他样品按地理分布聚一支, 其中武陵的YYH15117、YYH15118、YYH15119、YYH15120和YYH15121聚为一支, 这与Structure结构分析的结果一致。PCA结果表明, PC1和PC2的贡献率分别是62.2%和21.65% (图1C, 图中每个个体都用单独的圆表示, 不同颜色的圆代表不同的集群)。28份荷叶铁线蕨聚成明显的2组, 第一主成分PC1将武陵居群和余下5个居群分开, 与群体结构分析的结果一致, 群体间存在少数个体混杂现象, 说明所选群体之间存在基因交流, 与系统发育树结果相同。

2.5 群体大小历史分析

在Stairway Plot中对荷叶铁线蕨的群体大小随时间的变化进行推测。首先筛选不连锁的SNP数量

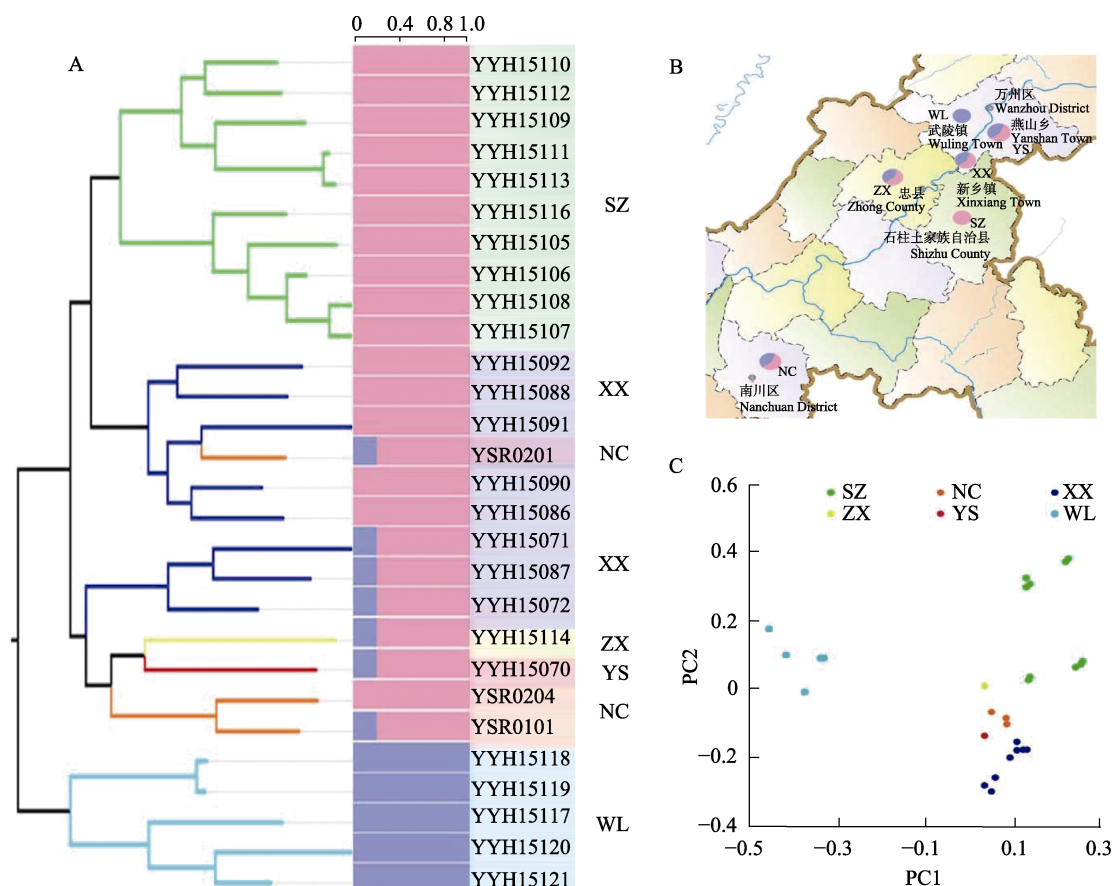


图1 基于SNP的荷叶铁线蕨遗传结构分析。A: 当 $K = 2$ 时每个个体的遗传成分分析结果和基于9,423个SNP的最大似然建树结果示。每一个柱形代表1个样本, 每种颜色代表1个遗传簇; B: 最佳聚类结果的地理分布, 其中的饼状图代表每个居群的遗传簇; C: 主成分分析结果, 图中每个点代表1个样品。样品信息同表1。

Fig. 1 Analysis of population structure based on identified SNP. A, Results of the admixture proportions for each individual with $K = 2$ and maximum likelihood tree based on 9,423 SNPs. Each sample is represented by a histogram, which is partitioned into different colors. Each color represents a genetic cluster. Numbers in the nodes are the bootstrap values from 100 replicates; B, The distribution of best results in clusters by Structure. The pie chart represents the genetic cluster of each population; C, Results of the principal component analysis. Each sample is represented by a point. The sample information is shown in Table 1.

9,423个, 依据图2A, Stairway Plot推测该种群100 kya至1 kya的有效群体大小变化(图2B)。如图所示, 荷叶铁线蕨115 kya至11.7 kya的末次冰期(last glacial period, LGP)经历种群收缩, 在11.2 kya的末次盛冰期(LGM)前经历种群扩张。这可能与冰期来临后, 荷叶铁线蕨对寒冷环境的极度不适应有关。在经历了长期的瓶颈效应后, 在15 kya左右, 种群才开始有轻微的扩张, 这可能是由于末次冰期结束后, 地球表面温度开始回升, 有利于荷叶铁线蕨的繁殖生长。

2.6 不同情景下潜在地理分布格局

根据主导气候因子贡献率(附录2)可知, 现代气候情况下对荷叶铁线蕨地理分布影响较大的气

候因子为昼夜温差月均值(42.4%)和最冷季降水量(20.9%), 累计贡献率达63.3%。从各主导因子的变异范围看, 荷叶铁线蕨适宜生境的气候因子变异范围极为狭窄, 表明其对气候要求极为严格。现代气候条件下, 荷叶铁线蕨潜在分布区与现存分布较为吻合(图3), 适生区域分布比较局限, 核心区位于重庆的万州至石柱县, 在中国的适生总面积为 $2.79 \times 10^4 \text{ km}^2$, 中适生区主要分布于石柱县和丰都县, 面积为 $0.66 \times 10^4 \text{ km}^2$; 低适生区主要分布于武陵县、南川区和长寿区等, 面积为 $1.62 \times 10^4 \text{ km}^2$ 。

在2080年RCP2.6温室气体排放情景下, 荷叶铁线蕨总适宜分布面积呈增加趋势, 总适生区面积为 $2.82 \times 10^4 \text{ km}^2$ 。但与现代相比, 荷叶铁线蕨潜在的

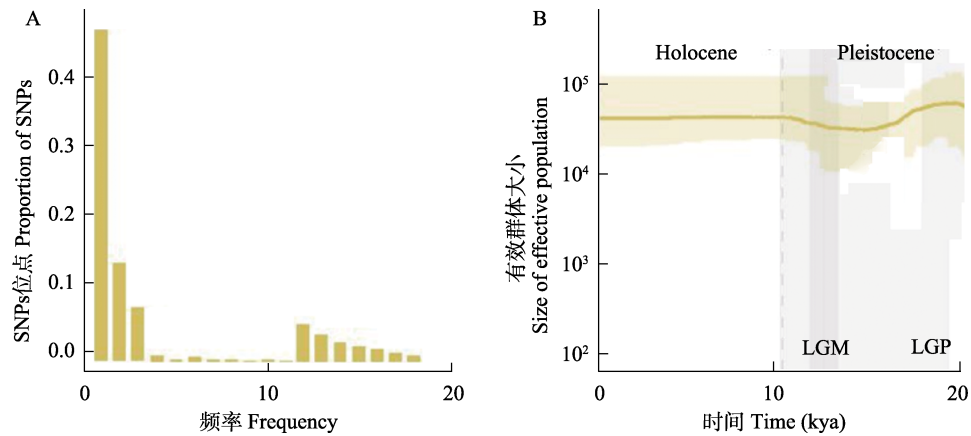


图2 荷叶铁线蕨有效群体大小变化分析。A: 位点频谱; B: Stairway Plot基于SFS的群体大小变化。粗线为中位数, 阴影部分为95%置信区间。LGM: 末次盛冰期; LGP: 末次冰期。

Fig. 2 Changes in population size of *Adiantum nelumboides*. A, Folded site frequency spectrum (SFS); B, Changes in population size inferred by Stairway plot using folded site frequency spectrum (SFS). Thick lines represent the median, and shaded areas represent the 95% confidence intervals. LGM, Last glacial maximum; LGP, Last glacial period.

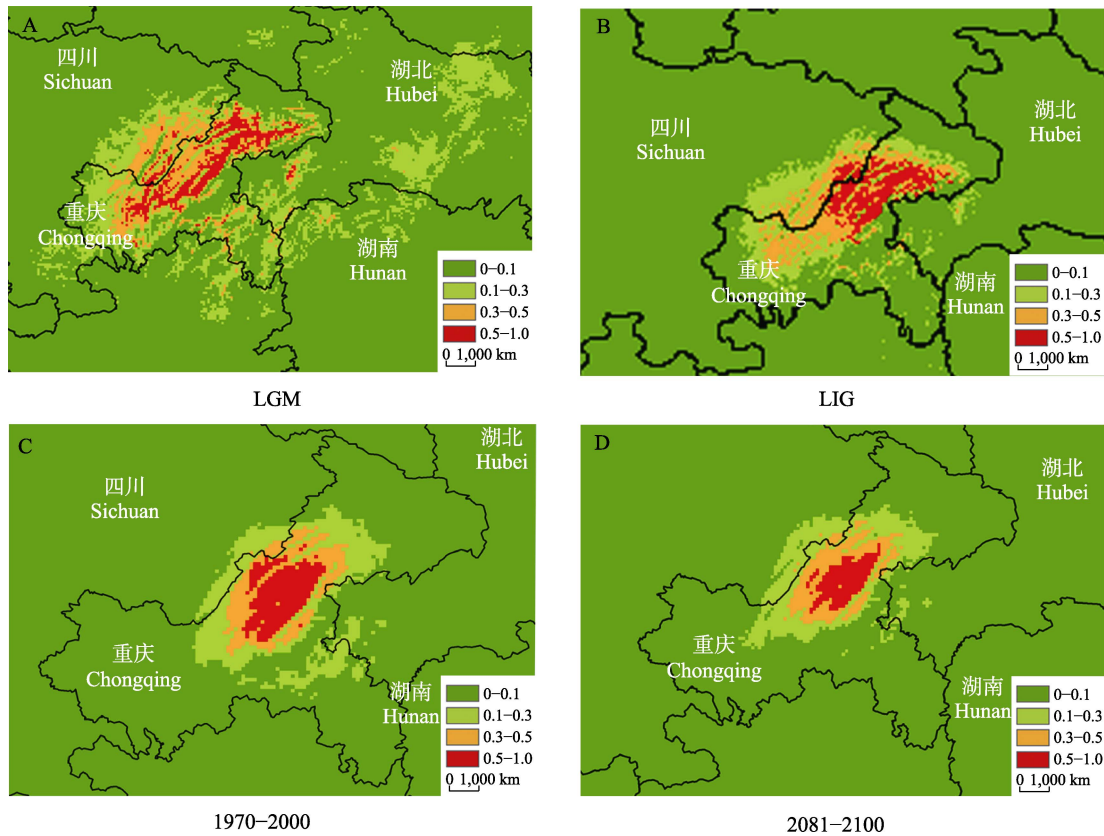


图3 不同时期荷叶铁线蕨适宜性生境分布。A: 末次盛冰期气候情景; B: 末次间冰期气候情景; C: 现代(1970–2000)气候情景; D: 未来(2081–2100) RCP2.6气候情景。

Fig. 3 Distribution of suitable habitats for *Adiantum nelumboides* in different periods. A, Last glacial maximum climate scenarios; B, Last interglacial climate scenarios; C, Contemporary (1970–2000) climate scenarios; D, Future (2081–2100) RCP2.6 climate scenarios.

高适生区面积呈收缩趋势(仍主要分布于重庆万州区一带), 减少为0.36 km², 减少了30.7%。中适生区

面积基本不变。随着生境破碎化严重, 大量的高适生区将会丧失并转化为中适生区。未来气候情景下,

其适宜区向西北和西南方向迁移, 新获得的生境主要集中在重庆市西部和四川省东部。荷叶铁线蕨在末次盛冰期的潜在分布存在一定差异。推断的末次盛冰期潜在分布偏北, 且分布范围更为广泛, 总适生区面积为 $11.45 \times 10^4 \text{ km}^2$, 在湖北、湖南、贵州、四川均有分布。在末次冰期的总适生区面积为 $6.02 \times 10^4 \text{ km}^2$, 是现代气候条件下适生面积的2.15倍, 高适生区向北迁移。

3 讨论

3.1 荷叶铁线蕨遗传多样性

遗传多样性评估是濒危物种保育的基础。濒危或分布狭窄的物种的一个普遍特征就是遗传多样性水平较低(Gitzendanner & Soltis, 2000)。本研究利用SNP分子标记对荷叶铁线蕨6个自然居群进行分析, 结果显示均具有较低的遗传多样性($H_o = 0.138$ 、 $H_e = 0.232$ 、 $P_i = 0.373$)。类似的结果也出现在濒危植物水蕨(*Ceratopteris thalictroides*) (Dong, 2007)、中华水韭(*Isoetes sinensis*) (陈进明等, 2004)与银杉(*Cathaya argyrophylla*) (冉巧等, 2019)中。杂合度(H)是目前应用较广泛的遗传多样性参数(Wang et al, 2017)。荷叶铁线蕨平均观测杂合度(0.138)小于平均期望杂合度(0.232), 各居群平均近交系数为0.143, 相比于水杉(*Metasequoia glyptostroboides*) (0.528, 苏金源等, 2020)、台湾油杉(*Keteleeria formosana* Hayata) (0.85, 李江伟等, 2014)、丹霞梧桐(*Firmiana danxiaensis*) (0.536, 廖坤富等, 2021)和珊瑚菜(*Glehnia littoralis*) (0.508, 李玲丽等, 2021)等极危植物, 呈现出相对低程度的杂合, 居群内存在不同程度的杂合子缺失、近交衰退现象。为评估荷叶铁线蕨的濒危等级是否可准确反映其当前遗传多样性水平, 分析了各物种核苷酸多态性与其在IUCN红色名录中的濒危等级的相关性(图3), 结果表明, 随着物种濒危程度的增加, 其遗传多样性降低, 各物种遗传多样性水平符合其濒危等级(附录4)。Godt和Hamrick (1991)认为居群遗传变异大小的主要影响因素依次为繁育系统、分布范围和生活型, 并认为地方特有种或狭域分布的种具有较低的遗传多样性。因此导致荷叶铁线蕨遗传多样性较低的原因可能是其对生存和繁衍条件要求较为苛刻, 常生长在空气和土壤湿度较高而排水良好的陡峭崖

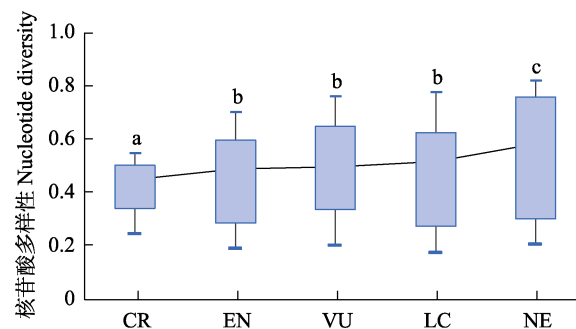


图4 植物遗传多样性与濒危程度分析。CR: 极危; EN: 濒危; VU: 易危; LC: 无危; NE: 未予评估。图中数据来源于附录4参考文献。

Fig. 4 Genetic diversity and endangered degree. CR, Critically Endangered; EN, Endangered; VU, Vulnerable; LC, Least Concern; NE, Not Evaluated. Data in the figure were from the references listed in Appendix 4.

壁中, 喜酸性土壤, 这使得荷叶铁线蕨物分布区域狭窄, 居群规模小, 从而引起近交衰退, 致使其遗传多样性丧失。

3.2 荷叶铁线蕨遗传结构与系统发育关系

遗传结构是一个物种最基本的特征之一, 受许多因素的影响, 包括生境片段化、繁育系统、基因流等(Ge et al, 2005)。荷叶铁线蕨主要有两种繁殖方式: 孢子繁殖和营养繁殖。但是荷叶铁线蕨孢子囊开裂较难且孢子成活率较低, 从萌发至形成幼孢子体需1年, 并且对生境要求严格, 其生长进程易受环境因素阻碍。因此, 理论上荷叶铁线蕨居群间基因流水平偏低。本研究结果证实, 与其他蕨类植物相比(Chen et al, 2004), 其居群内遗传变异较高(97.98%), 而居群间遗传分化较小。居群遗传结构的形成与基因流(Nm)密切相关, Hogbin和Peakall (1999)认为异交物种的遗传变异主要分布在居群内。因此, 荷叶铁线蕨应属于异交物种, 由于石壁阻挡, 从而形成狭域、小群体的特殊分布模式, 经几代无性繁殖后, 造成了遗传多样性较低的现状。

明确荷叶铁线蕨的遗传结构和系统发育关系是保护荷叶铁线蕨的背景和前提。荷叶铁线蕨的群体间特别是地理组群间也存在一定程度的遗传变异。本研究从28个荷叶铁线蕨的遗传结构分析可看出, 不同居群间的遗传距离与其地理分布有着密切关系, 基于Structure分析和PCA分析, 荷叶铁线蕨的6个自然居群可分为2个谱系, 均来自2种遗传分组。其中武陵居群和石柱居群都具有独有的遗传分

组。群体之间并非完全独立, 存在着一定的基因渗透现象。因此, 初步推测荷叶铁线蕨群体历史分布区可能是连续的。

3.3 荷叶铁线蕨的群体历史和潜在分布格局

从2.4个百万年至今的第四纪(Quaternary), 由持续寒冷而干燥的冰期及相对温暖和潮湿的短暂间冰期交替组成(Comes & Kadereit, 1998)。不同物种对第四纪冰期气候变化的响应是有区别的。一些物种的分布区经向或纬向发生改变, 另一些物种的分布范围受到强烈影响退至其冰期避难所(Holder et al, 1999)。

冰期避难所指冰期时物种在剧烈波动的气候影响下而迁移到能够存活区域, 这些区域同时也是冰期后物种重新扩散的起点。冰期避难所通常是许多濒危物种的热点分布区(Hewitt, 2000)。这些区域物种的分布区和种群数量均受到第四纪冰期不同程度的影响。许多物种的长期冰期避难所由于涵盖了物种现存的最高遗传变异水平, 在物种保护过程中常被指定为优先保护区域(Comes & Kadereit, 1998)。我国西南地区气候相对稳定, 因此成为许多孑遗植物的长期避难所(Tang et al, 2018)。本研究中荷叶铁线蕨分布在我国西南地区的重庆, 涵盖了我国植物的大部分冰期避难所。




物种的历史群体动态是其遗传特性和所经历的历史事件共同作用的结果(Hewitt, 2000), 可用于预测物种当前和未来的生活力, 常用于衡量群体生存力的大小(Wang et al, 2017)。本研究使用大量SNP标记研究荷叶铁线蕨的种群历史, 结果显示其在11.7 kya的末次冰期(LGP)经历种群收缩, 在11.2 kya的末次盛冰期(LGM)前经历种群扩张。与利用最大熵模型模拟的荷叶铁线蕨在末次盛冰期、末次冰期气候情景下的潜在分布格局相符合。由此推测荷叶铁线蕨的历史分布区较现在广, 在冰期循环的气候波动下经历空间分布区的变化, 形成目前的分布格局。

与现代气候相比, 在未来气候变化下濒危植物荷叶铁线蕨的潜在分布区面积略有增加, 其中高适生区面积减少, 中、低适生区面积显著增加。荷叶铁线蕨当前潜在适生区主要位于重庆市中部, 高适生区与实际现存野生种群分布区与三峡库区高度一致(余顺慧等, 2013)。未来气候变化情景下, 适生

区呈扩张趋势, 昼夜温差月均值和最冷季降水量是影响荷叶铁线蕨潜在分布的主导气候因子。沈泽昊等(1999)根据荷叶铁线蕨仅自然分布于海拔430 m以下、且海拔300 m以上生长不佳的事实, 推测海拔高度引起的昼夜温差变化对其分布有重要影响, 本研究结果与这一推断一致。荷叶铁线蕨适宜分布区的气候因子变异极小, 表明其对气候的要求极为严格。另外, 环境因素(生物因素、非生物因素、微环境等)的变化也会影响物种的遗传多样性水平(李昂和葛颂, 1977)。由于三峡库区蓄水后水位上升导致低海拔的荷叶铁线蕨生境被淹没, 加之荷叶铁线蕨是一种形态独特的观赏植物及其药用价值被逐步了解, 当地居民随意采挖现象愈加严重。两种因素叠加导致荷叶铁线蕨居群的规模变得更小, 大多数地区仅发现几棵植株, 促使居群内近交现象越发严重, 可能因此导致种群的遗传多样性处于较低水平。研究表明, 未来气候变化情景下荷叶铁线蕨适生区向西北迁移, 这可能与气候变暖条件下亚热带北界向北推移(Tingley et al, 2014)有很大的关联。

荷叶铁线蕨在中国境内的分布范围极其狭窄, 仅在重庆地区有发现, 野外资源非常稀少且人为采挖严重。如万州区长坪乡曾经有大量的分布, 但近年来栖息地逐渐减少, 野生资源也遭到严重采挖, 该地区已经极难发现野生居群。此外, 荷叶铁线蕨从孢子萌发到形成幼孢子体需要1年时间, 且孢子囊较难开裂, 这些特征都不利于其在野外的自我繁殖和资源更新。因此, 荷叶铁线蕨的野生资源亟待保护, 建议: (1)将武陵居群和其他居群作为两个保护单元加以保护, 同时要尽可能多地保护具有不同遗传分组的样本个体; (2)加强对当地居民的宣传工作, 减少人为破坏; (3)在开展就地保护的基础上通过建立种质资源苗圃、人工繁育等方式进行异地保护。

ORCID

孙维悦  <https://orcid.org/0000-0001-8688-5070>
舒江平  <https://orcid.org/0000-0001-9714-3064>
严岳鸿  <https://orcid.org/0000-0001-6768-2833>

参考文献

- Chen JM, Wang JY, Liu X, Zhang YW, Wang QF (2004) RAPD analysis for genetic diversity of *Isoetes sinensis*. Biodiversity Science, 12, 348–353. (in Chinese with English abstract) [陈进明, 王晶苑, 刘星, 张彦文, 王青锋 (2004) 中华水韭遗传多样性的RAPD分析. 生物多样性, 12,

- 348–353.]
- Chen SC (2014) Research progress on the national rare and endangered medicinal plant of *Adiantum reniforme* L. var. *sinense* in the Three Gorges Reservoir Region. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 21, 129–133. (in Chinese) [陈绍成 (2014) 三峡库区国家珍稀濒危药用植物荷叶铁线蕨研究进展. 中国中医药信息杂志, 21, 129–133.]
- Cires E, Samain MS, Goetghebeur P, Prieto JAF (2011) Genetic structure in peripheral Western European populations of the endangered species *Cochlearia pyrenaica* (Brassicaceae). Plant Systematics and Evolution, 297, 75–85.
- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. Trends in Plant Science, 3, 432–438.
- Dong SY, Zuo ZY, Yan YH, Xiang JY (2017) Red list assessment of lycophytes and ferns in China. Biodiversity Science, 25, 765–773. (in Chinese with English abstract) [董仕勇, 左政裕, 严岳鸿, 向建英 (2017) 中国石松类和蕨类植物的红色名录评估. 生物多样性, 25, 765–773.]
- Fu LK, Jin JM (1992) China Plant Red Data Book (Vol. 1): Rare and Endangered Plants. Science Press, Beijing. (in Chinese and in English published in 1991 and 1992 respectively) [傅立国, 金鉴明 (1991) 中国植物红皮书: 稀有濒危植物(第一册). 科学出版社, 北京.]
- Fu YB, Cheng BF, Peterson GW (2014) Genetic diversity analysis of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) germplasm based on genotyping by sequencing. Genetic Resources and Crop Evolution, 61, 579–594.
- Ge XJ, Zhang LB, Yuan YM, Hao G, Chiang TY (2005) Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by inter-simple sequence repeats (ISSR). Biodiversity & Conservation, 14, 849–861.
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. American Journal of Botany, 87, 783–792.
- Godt MJW, Hamrick JL (1991) Genetic variation in *Lathyrus latifolius* (Leguminosae). American Journal of Botany, 78, 1163–1171.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature, 405, 907–913.
- Hogbin PM, Peakall R (1999) Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*. Conservation Biology, 13, 514–522.
- Holder K, Montgomerie R, Friesen VL (1999) A test of the glacial refugium hypothesis using patterns of mitochondrial and nuclear DNA sequence variation in rock ptarmigan (*Lagopus mutus*). Evolution, 53, 1936–1950.
- Huang ZH (2020) The research progress of endangered causes and protection strategy of rare and endangered plants in China. Journal of University of South China (Science and Technology), 34(3), 42–50. (in Chinese with English abstract) [黄至欢 (2020) 中国珍稀植物濒危原因及保护对策研究进展. 南华大学学报(自然科学版), 34(3), 42–50.]
- Huenneke LF (1991) Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: Genetics and Conservation of Rare Plants (eds Falk DA, Holsinger KE), pp. 31–44. Oxford University Press. New York.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature) (2010) IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>. (accessed on 2021-11-18)
- Li A, Ge S (2002) Advances in plant conservation genetics. Biodiversity Science, 10, 61–71. (in Chinese with English abstract) [李昂, 葛颂 (2002) 植物保护遗传学研究进展. 生物多样性, 10, 61–71.]
- Li H, Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. Bioinformatics, 26, 589–595.
- Li JW, Yang QJ, Liu XQ, Ji H, Zhang ZW (2014) Genetic diversity of *Taiwania cryptomerioides* detected by ISSR analysis. Scientia Silvae Sinicae, 50(6), 61–66. (in Chinese with English abstract) [李江伟, 杨琴军, 刘秀群, 季华, 张卓文 (2014) 台湾杉遗传多样性的ISSR分析. 林业科学, 50(6), 61–66.]
- Li LL, Zhou YF, Xu M, Li MM, Xu ZL (2021) Analysis of SSR loci information in the transcriptome of *Glehnia littoralis*. Molecular Plant Breeding, 19, 4708–4713. (in Chinese with English abstract) [李玲丽, 周义峰, 徐明, 李密密, 徐增莱 (2021) 珊瑚菜转录组的SSR位点信息分析. 分子植物育种, 19, 4708–4713.]
- Liao KF, Hu C, Hu XJ, Zhang JY, Wang MN, Wang KL, Wei BJ, Xiao ZP (2021) A study on plant diversity evaluation in Danxia Wutong Nature Reserve in Nanxiong City. Ecological Science, 40, 156–164. (in Chinese with English abstract) [廖坤富, 胡纯, 胡希军, 张九月, 王梦楠, 王凯丽, 韦宝婧, 肖志鹏 (2021) 广东南雄丹霞梧桐自然保护区植物多样性评价. 生态科学, 40, 156–164.]
- Liu ZL, Zhao LY, Zhu XQ (2010) The current study situation of Chinese biodiversity and its protective planning development. Chinese Landscape Architecture, 26, 81–83. (in Chinese with English abstract) [刘张璐, 赵兰勇, 朱秀芹 (2010) 中国生物多样性及其保护规划发展研究现状. 中国园林, 26, 81–83.]
- Ma KP, Qian YQ (1998) Biodiversity conservation and its research progress. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 4, 95–99. (in Chinese with English abstract) [马克平, 钱迎倩 (1998) 生物多样性保护及其研究进展. 应用与环境生物学报, 4, 95–99.]
- Miller MR, Dunham JP, Amores A, Cresko WA, Johnson EA (2007) Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. Genome Research, 17, 240–248.
- Pan LQ, Ji H, Chen LQ (2005) Genetic diversity of the natural populations of *Adiantum reniforme* var. *sinense*. Biodiversity Science, 13, 122–129. (in Chinese with English abstract)

- abstract) [潘丽芹, 季华, 陈龙清 (2005) 荷叶铁线蕨自然居群的遗传多样性研究. 生物多样性, 13, 122–129.]
- Pegadaraju V, Nipper R, Hulke B, Qi LL, Schultz Q (2013) De novo sequencing of sunflower genome for SNP discovery using RAD (Restriction site Associated DNA) approach. BMC Genomics, 14, 556.
- Ran Q, Wei HY, Zhao ZF, Zhang QZ, Liu J, Gu W (2019) Impact of climate change on the potential distribution and habitat fragmentation of the relict plant *Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang. Acta Ecologica Sinica, 39, 2481–2493. (in Chinese with English abstract) [冉巧, 卫海燕, 赵泽芳, 张权中, 刘静, 顾蔚 (2019) 气候变化对孑遗植物银杉的潜在分布及生境破碎度的影响. 生态学报, 39, 2481–2493.]
- Reid WV, Laird SA, Meyer CA, Gamez R, Juma CWRI (1993) Biodiversity Prospecting: Using Genetic Resources for Sustainable Development. World Resources Institute (WRI), New York.
- Shen ZH, Jin YX, Wu JQ, Zhao ZE (1999) An contrast on the characteristics of soil in the natural habitat and resite reserve of two endemic species of the Three Gorges reservoir region of Yangzi River. Journal of Wuhan Botanical Research, 17, 46–52. (in Chinese with English abstract) [沈泽昊, 金义兴, 吴金清, 赵子恩 (1999) 三峡库区两种特有植物天然生境与迁地生境土壤特征的比较. 武汉植物学研究, 17, 46–52.]
- Solomon AM, Han K, Lee JH, Lee HY, Jang S, Kang BC (2019) Genetic diversity and population structure of Ethiopian *Capsicum* germplasms. PLoS ONE, 14, e0216886.
- Su JY, Yan Y, Li C, Li D, Du FK (2020) Informing conservation strategies with genetic diversity in Wild Plant with Extremely Small Populations: A review on gymnosperms. Biodiversity Science, 28, 376–384. (in Chinese with English abstract) [苏金源, 燕语, 李冲, 李丹, 杜芳 (2020) 通过遗传多样性探讨极小种群野生植物的致濒机理及保护策略: 以裸子植物为例. 生物多样性, 28, 376–384.]
- Tang CQ, Matsui T, Ohashi H, Dong YF, Momohara A, Herrando-Moraira S, Qian SH, Yang YC, Ohsawa M, Luu HT, Grote PJ, Krestov PV, LePage B, Werger M, Robertson K, Hobohm C, Wang CY, Peng MC, Chen X, Wang HC, Su WH, Zhou R, Li SF, He LY, Yan K, Zhu MY, Hu J, Yang RH, Li WJ, Tomita M, Wu ZL, Yan HZ, Zhang GF, He H, Yi SR, Gong HD, Song K, Song D, Li XS, Zhang ZY, Han PB, Shen LQ, Huang DS, Luo K, López-Pujol J (2018) Identifying long-term stable refugia for relict plant species in East Asia. Nature Communications, 9, 4488.
- Tingley R, Vallinoto M, Sequeira F, Kearney MR (2014) Realized niche shift during a global biological invasion. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 111, 10233–10238.
- Wang AH, Sun Y, Schneider H, Zhai JW, Liu DM, Zhou JS, Xing FW, Chen HF, Wang FG (2015) Identification of the relationship between Chinese *Adiantum reniforme* var. *sinense* and canary *Adiantum reniforme*. BMC Plant Biology, 15, 36.
- Wang WC, Chen SY, Zhang XZ (2017) The complete chloroplast genome of the endangered Chinese paperbark maple, *Acer griseum* (Sapindaceae). Conservation Genetics Resources, 9, 527–529.
- Wu JG, Huang JH, Han XG, Xie ZQ, Gao XM (2003) Three-Gorges Dam—Experiment in habitat fragmentation? Science, 300, 1239–1240.
- Yu SH, Ran G, Jiang XM, Deng HP, Zhou XC (2013) Study on accompanying vascular plants of *Adiantum reniforme* var. *sinense* community in Three Gorges Reservoir area. Guangdong Agricultural Sciences, 40, 145–147. (in Chinese with English abstract) [余顺慧, 冉谷, 蒋雪梅, 邓洪平, 周兴成 (2013) 三峡库区珍稀濒危植物荷叶铁线蕨群落伴生维管植物研究. 广东农业科学, 40, 145–147.]

(责任编辑: 陈进明 责任编辑: 周玉荣)

附录 Supplementary Material

附录1 荷叶铁线蕨简化基因组平均GC含量

Appendix 1 Average GC content of *Adiantum nelumboides* for genotyping by sequencing (GBS) reduced-representation genome sequencing

<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021508-1.pdf>

附录2 模拟荷叶铁线蕨潜在适宜分布的主要气候因子及其贡献率

Appendix 2 Main climatic factors used for simulating suitable area of *Adiantum nelumboides* and their contribution rate

<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021508-2.pdf>

附录3 不同气候变化情景下荷叶铁线蕨植物适生区面积及其占比的动态变化

Appendix 3 Dynamics of changes in suitable habitat area of *Adiantum nelumboides* under different climate scenarios

<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021508-3.pdf>

附录4 图4中植物遗传多样性数据来源文献

Appendix 4 References of plant genetic diversity data in Fig. 4

<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021508-4.pdf>

孙维悦, 舒江平, 顾钰峰, 莫日根高娃, 杜夏瑾, 刘保东, 严岳鸿 (2022) 基于保护基因组学揭示荷叶铁线蕨的濒危机制. 生物多样性, 30, 21508. <https://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2021508>.

附录 1 荷叶铁线蕨简化基因组平均 GC 含量

Appendix 1 Average GC content of *Adiantum nelumboides* for GBS reduced-representation genome sequencing

居群 Population	采样地点 Sampling localities	样品采集号 Sample voucher no.	GC 含量 GC content (%)
石柱 SZ	重庆市石柱县西沱镇 Xituo Town, Shizhu County, Chongqing	YYH15105	40.8
		YYH15106	40.3
		YYH15107	40.6
		YYH15108	41.4
		YYH15109	40.4
		YYH15110	41.1
		YYH15111	41.3
		YYH15112	41.6
		YYH15113	40.1
		YYH15116	40.5
南川 NC	重庆市南川区 Nanchuan District, Chongqing	YSR0101	40.2
		YSR0102	39.9
		YSR0103	39.2
新乡 XX	重庆市万州区新乡镇 Xinxiang Town, Wanzhou District, Chongqing	YYH15071	40.6
		YYH15072	40.2
		YYH15086	39.9
		YYH15087	40.5
		YYH15088	40.2
		YYH15090	40.4
		YYH15091	39.3
		YYH15092	40.2
燕山 YS	重庆市万州区燕山乡 Yanshan Town, Wanzhou District, Chongqing	YYH15070	40.2
武陵 WL	重庆市万州区武陵镇 Wuling Town, Wanzhou District, Chongqing	YYH15117	40.2
		YYH15118	40.1
		YYH15119	40.9
		YYH15120	40.8
		YYH15121	40.2
忠县 ZX	重庆市忠县石宝镇 Shibao Town, Zhong County, Chongqing	YYH15114	40.6

附录 2 模拟荷叶铁线蕨潜在适宜分布的主要气候因子及其贡献率
Appendix 2 Main climatic factors used for simulating suitable area of *Adiantum nelumboides* and their contribution rate

代码 Code	气候因子 Environmental variable	贡献率 Contribution rate (%)
Bio2	昼夜温差月均值 Mean diurnal range	42.4
Bio19	最冷季降水量 Precipitation of coldest quarter	20.9
Bio3	等温性 Isothermality (Bio2 /Bio7) (× 100)	10.5
Bio12	年降水量 Annual precipitation	9.5
Bio15	降水量季节性变化 Precipitation seasonality	7.4
Bio10	最热季平均温度 Mean temperature of warmest quarter	6.5
Bio13	最湿月降水量 Precipitation of wettest month	2.6
Bio4	温度季节性变化 Temperature seasonality	0.1
Bio7	年温度变化范围 Temperature annual range	0.1
Bio11	最冷季平均温度 Mean temperature of coldest quarter	0
Bio16	最湿季降水量 Precipitation of wettest quarter	0
Bio8	最湿季平均温度 Mean temperature of wettest quarter	0
Bio14	最干月降水量 Precipitation of driest month	0
Bio9	最干季平均温度 Mean temperature of driest quarter	0

孙维悦, 舒江平, 顾钰峰, 莫日根高娃, 杜夏瑾, 刘保东, 严岳鸿 (2022) 基于保护基因组学揭示荷叶铁线蕨的濒危机制. 生物多样性, 30, 21508. <https://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2021508>.

附录 3 不同气候变化情景下荷叶铁线蕨植物适生区面积及其占比的动态变化
Appendix 3 Dynamics of changes in suitable habitat area of *Adiantum nelumboides* under different climate scenarios

时段 Period	总适生面积 Total suitable area × 10 ⁴ km ²	高度适生 Highly suitable		中度适生 Moderately suitable		低度适生 Marginally suitable		不适生 Unsuitable	
		面积 Area ×10 ⁴ km ²	比例 Percentage e%	面积 Area×10 ⁴ m ²	比例 Percentage (%)	面积 Area × 10 ⁴ km ²	比例 Percentage %	面积 Area × 10 ⁴ km ²	比例 Percentage %
LGM	11.45	1.23	0.12	2.37	0.23	7.87	0.79	975.31	98.83
LGP	6.02	1.11	0.11	1.66	0.17	3.24	0.33	954.81	99.39
Current	2.79	0.52	0.05	0.66	0.07	1.62	0.17	959.27	99.7
2080s	2.82	0.36	0.04	0.64	0.07	1.82	0.19	959.23	99.7

附录 4 图 4 中植物遗传多样性数据来源文献

Appendix 4 References of data in Fig. 4

- Chen JM, Wang QF (2006) Genetic diversity in the rare and endangered fern *Isoetes orientalis*. Journal of Wuhan Botanical Research, 24, 569–573. (in Chinese with English abstract) [陈进明, 王青峰 (2006) 珍稀濒危蕨类植物东方水韭的遗传多样性. 武汉植物学研究, 24, 569–573.]
- Chen T, Zhou RC, Ge XJ, Shi SH (2008) Development and characterization of microsatellite markers for a mangrove tree species *Sonneratia caseolaris* (L.) Engler (Lythraceae *sensu lato*). Conservation Genetics, 9, 957–959.
- Cibrián-Jaramillo A, Hahn WJ, Desalle R (2008) Permanent genetic resources: Development of microsatellite markers of the Mexican understorey palm *Chamaedorea elegans*, cross-species genotyping, and amplification in congeners. Molecular Ecology Resources, 8, 322–324.
- Ducarme V, Risterucci AM, Wesselingh RA (2008) Permanent Genetic Resources: Development of microsatellite markers in *Rhinanthus angustifolius* and cross-species amplification. Molecular Ecology Resources, 8, 384–386.
- Dharmarajan G, Fike JA, Beasley JC, Rhodes OE Jr (2009) Development and characterization of 14 polymorphic microsatellite loci in the raccoon tick (*Ixodes texanus*). Molecular Ecology Resources, 9, 296–298.
- Escribano P, Viruel MA, Hormaza JI (2008) PERMANENT GENETIC RESOURCES: Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): Transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. Molecular Ecology Resources, 8, 317–321.
- Fan XJ, Wang GB, Yang XM, Zhou TT, Ren Z (2021) Distribution and sequence characterization of SSR in *Ginkgo biloba* transcriptions. Non-Wood Forest Research, 39, 63–73. (in Chinese with English abstract) [范雪娇, 汪贵斌, 杨晓明, 周婷婷, 任重 (2021) 银杏转录组 SSR 位点分布及其序列特征分析. 经济林研究, 39, 63–73.]
- Geng QF, Lian CL, Tao JM, Qiu RL, Hogetsu T (2006) Development of microsatellite markers in a mangrove tree species *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae). Molecular Ecology Notes, 6, 1231–1233.
- Gaskin JF, Hufbauer RA, Bogdanowicz SM (2013) Microsatellite markers for Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*; Elaeagnaceae). Applications in Plant Sciences, 1, 1300013.
- Hu K, Huang XF, Ke WD, Ding Y (2009) Characterization of 11 new microsatellite loci in taro (*Colocasia esculenta*). Molecular Ecology Resources, 9, 582–584.
- Huang J, Chen Z, Li J, Shang HW (2014) Genetic diversity of *Huperzia serrata* (Huperziaceae) in Wuling Mountains area detected by AFLP. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 34, 83–92. (in Chinese with English abstract) [黄骥, 陈浙, 李菁, 商晗武 (2014) 武陵山区蛇足石杉遗传多样性的 AFLP 分析. 西北植物学报, 34, 83–92.]
- Kong Q, Xiang C, Yu Z, Zhang C, Liu F, Peng C, Peng X (2007) Mining and characterizing microsatellites in *Cucumis melo* expressed sequence tags from sequence database. Molecular Ecology Notes, 7, 281–283.
- Kikuchi S, Shibata M (2008) PERMANENT GENETIC RESOURCES: Development of polymorphic microsatellite markers in *Acer mono* Maxim. Molecular Ecology Resources, 8, 339–341.
- Kubik C, Honig J, Bonos SA (2011) Characterization of 215 simple sequence repeat markers in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). Molecular Ecology Resources, 11, 872–876.
- Larson EL, Bogdanowicz SM, Agrawal AA, Johnson MTJ, Harrison RG (2008) Permanent Genetic Resources: Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in common evening primrose (*Oenothera biennis*). Molecular Ecology Resources, 8, 434–436.
- Liu JF, Xiao WF (2008) RAPD analysis of the genetic diversity of a critically endangered plant, *Thuja sutchuenensis* (Cupressaceae). Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 30, 68–72. (in Chinese with English abstract) [刘建锋, 肖文发 (2008) 濒危植物崖柏遗传多样性的 RAPD 分析. 江西农业大学学报, 30, 68–72.]
- McGlaughlin ME, Riley L, Helenurm K (2009) Isolation of microsatellite loci from the endangered plant *Galium catalinense* subspecies *acrispum* (Rubiaceae). Molecular Ecology Resources, 9, 984–986.
- Nagai H, Yoshida T, Kamiya K, Yahara T, Tachida H (2009) Development and characterization of microsatellite markers in *Zanthoxylum ailanthoides* (Rutaceae). Molecular Ecology Resources, 9, 667–669.

孙维悦, 舒江平, 顾钰峰, 莫日根高娃, 杜夏瑾, 刘保东, 严岳鸿 (2022) 基于保护基因组学揭示荷叶铁线蕨的濒危机制. 生物多样性, 30, 21508. <https://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2021508>.

- Szczecińska M, Kwaśniewski M, Chwiałkowska K, Sawicki J (2013) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pulsatilla patens* (L.) Mill. (Ranunculaceae) a rare and endangered plant species in Europe. Conservation Genetics Resources, 5, 421–423.
- Wu XT, Chen L, Wang MQ, Zhang Y, Lin XY, Li XY, Zhou H, Wen YF (2018) Population structure and genetic divergence in *Firmiana danxiaensis*. Biodiversity Science, 26, 1168–1179. (in Chinese with English abstract) [武星彤, 陈璐, 王敏求, 张原, 林雪莹, 李鑫玉, 周宏, 文亚峰 (2018) 丹霞梧桐群体遗传结构及其遗传分化. 生物多样性, 26, 1168–1179.]
- Wu LX, Gong X, Pan YZ (2020) Study on genetic diversity and differentiation of *Panax zingiberensis* C. Y. Wu et K. W. Feng. Plant Science Journal, 38, 525–535. (in Chinese with English abstract) [吴丽新, 龚洵, 潘跃芝 (2020) 姜状三七遗传多样性和遗传分化研究. 植物科学学报, 38, 525–535.]
- Yakimowski SB, Rymer PD, Stone H, Barrett SCH, Dorken ME (2009) Isolation and characterization of 11 microsatellite markers from *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). Molecular Ecology Resources, 9, 579–581.
- Zhang JC, Song YH, Zhu Y, Zhang HY, Zhong Y (2011) AFLP analysis of genetic diversity and population structure of *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) trev. var. *longipetiolata* (Spring) H. M. Chang. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 17, 18–23. (in Chinese with English abstract) [张君诚, 宋育红, 朱勇, 张杭颖, 钟扬 (2011) 长柄石杉居群遗传多样性和遗传结构的 AFLP 分析. 应用与环境生物学报, 17, 18–23.]
- Zavodna M, Bottin L, Lambourdiere J, Machon N (2009) Development and characterization of microsatellite markers for *Arenaria grandiflora* L. (Caryophyllaceae). Molecular Ecology Resources, 9, 628–630.