子遗植物水杉的遗传多样性研究

李晓东 黄宏文 李建强*

(中国科学院武汉植物研究所武汉植物园, 武汉 430074)

摘要:采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 方法对子遗植物水杉 (*Metasequoia glyptostroboides*) 的 8 个居群 (包括 6 个子遗居群和 2 个人工栽培居群) 的 48 个个体进行了遗传多样性研究。用 16 个随机引物共扩增出清晰谱带 57 条。子遗居群平均多态位点百分率为 38.6%。各居群多态位点百分率差异显著 (10.53% ~ 33.33%)。湖北利川的小河和桂花 2 个居群较高, 分别是 33.33% 和 31.58%。湖南龙山洛塔居群较低, 为 10.53%。人工栽培居群中, 美国密西根州和湖北武汉 2 个居群的多态位点百分率也较低, 仅分别为 10.53% 和 8.77%。用 POPGENE 1.31 版软件进行数据处理后结果如下: 子遗居群的平均 Nei's 基因多样性为 0.1305, Shannon's 遗传多样性信息指数为 0.1921, 水杉子遗居群遗传距离与地理距离的相关系数 $r = 0.23466$ ($P = 73.27\%$)。基因分化系数 $G_{st} = 0.1082$, 表明居群间有一定分化。用 UPGMA 方法聚类可知 2 个人工居群与湖北利川居群优先聚类。鉴于目前水杉子遗居群生境人为破坏严重、遗传多样性较低和原生母树分布分散, 建议在湖北利川小河和桂花野生水杉最适生境建立水杉遗传多样性保护点, 将现有的 250 多株原生母树分别采种育苗定植于保护点, 以达到最大限度地保存现有水杉遗传多样性的目的。

关键词:子遗植物, 水杉, RAPD, 遗传多样性, 保护

中图分类号: Q16, Q34 文献标识码: A 文章编号: 1005-0094(2003)02-0100-09

Genetic diversity of the relict plant *Metasequoia glyptostroboides*

LI Xiao-Dong, HUANG Hong-Wen, LI Jian-Qiang*

Wuhan Botanical Garden/ Wuhan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074

Abstract: Forty-eight individuals of eight populations of *Metasequoia glyptostroboides* (Dawn Redwood), including six relict populations and two cultivated, were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to determine the genetic variations among and within the populations. A total of 57 loci (including 22 polymorphic loci) were amplified using 16 random primers. The average percentage of polymorphic loci (PPL) was 38.6% in the relict populations. The difference of the percentage of polymorphic loci among all the populations was evident (10.53% ~ 33.33%). Of the eight populations, Xiaohu and Guihua populations in Lichuan City, Hubei had high PPL (33.33% and 31.58%), while the population in Longshan Luota, Hunan had relatively low PPL (10.53%), and the two cultivated populations also had low PPL (10.53% and 8.77%). As analyzed by POPGENE version 1.31, the data from the relict populations has an average Nei's gene diversity of 0.1305, and Shannon's genetic diversity of 0.1921. Correlation coefficient between genetic distance and geographic distance was 0.23466 ($P = 73.27\%$). Among the relict populations, G_{st} was 0.1082, indicating that there was some differentiation among the populations. The two cultivated populations and the two Lichuan relict populations clustered together. In view of the damage and fragmentation of original habitats, the low genetic diversity and the dispersed distribution of wild *Metasequoia glyptostroboides*, we suggest establishing a conservation spot in

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(G2000046806)、中国科学院方向性项目(KSCX2-SW-104)和中国科学院武汉植物研究所所长基金的资助项目(01005115)。

收稿日期: 2002-10-22; 接受日期: 2002-12-10

作者简介: 李晓东, 男, 1966 年出生, 在职博士研究生, 助理研究员, 主要从事生物多样性研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: jianqiangli@hotmail.com

the optimal habitat of Xiaohe and Guihua in Lichuan , where we can breed and plant seeds from the remaining 250 wild trees. By this means , the remaining genetic diversity resources of the species can be preserved to the greatest extent.

Key words : relict plant , *Metasequoia glyptostroboides* , RAPD , genetic diversity , conservation

水杉(*Metasequoia glyptostroboides*)是我国特有的珍稀植物 ,它的发现是 20 世纪植物学和古植物学界的一件大事。1941 年 Miki 根据日本东京附近的上新世化石植物标本(*Sequoia disticha* Heer and *Sequoia japonica* Endo)建立了水杉属(*Metasequoia*) ,同时认定这类化石植物在地球上已不复存在(Miki , 1941) ;同年我国植物学家干铎在四川万县磨刀溪(今湖北利川谋道镇)发现了一棵无名古树 ,后来经胡先骕和郑万钧鉴定并定名 ,发现它就是过去只见化石未见活植物的活化石植物——水杉(Hu & Cheng , 1948)。水杉是杉科单种属植物 ,其染色体数目 $2n = 22$ (Stebbins , 1948 ; 李林初 , 1986)。1947 年郑万钧将从湖北利川采得的 1 kg 水杉种子寄往美国(Merrill , 1948 ; Satoh , 1999) ,拉开了这一珍贵植物引种到世界各地的序幕。自水杉被发现以来 ,经过半个多世纪的努力 ,水杉由一个仅子遗于我国重庆、湖北、湖南交界的石柱、利川、龙山的非常狭窄分布区而濒临灭绝的物种 ,迅速地扩展到从 60°N 的挪威、芬兰、美国阿拉斯加到 35°S 的阿根廷(布宜诺斯艾利斯) ,全球 50 多个国家和地区直接或间接引种过我国的水杉 ,其引种栽培区已远远超过其历史上的分布区 ,并显示出极强的适应性(林协 , 1976 ; Satoh , 1999)。这是否意味着人类已成功地完成了对水杉的保护工作 ? 要回答这个问题 ,进行水杉子遗居群和人工居群遗传多样性差异的研究是十分必要的。

以往对水杉的研究大都集中在其分布、生态、形态、细胞、胚胎发育等方面(郑万钧 , 曲仲湘 , 1949 ; 斯行健 , 1951 ; 王伏雄 , 钱南芬 , 1964 ; 李林初 , 1986 ; 李建华 , 班继德 , 1989 ; Chu & Cooper , 1950 ; Bartholomew *et al.* , 1983 ; Fulling , 1976 ; Hu , 1948)。到目前为止 ,对水杉遗传多样性的研究却不多 ,只有 Kuser (1997)、张文英和李明鹤(1994)采用同工酶方法 ,李春香等(1999)用 RAPD 方法对水杉的遗传多样性进行过研究。李春香等的研究采用的样本较少 ,在 27 个样本中包含了栽培树、原生树和嫁接树。本研究的目的在于 : 1)对水杉子遗居群结构和数量进

行调查 2)研究水杉子遗居群的遗传结构 3)为有效保护水杉提供科学的取样策略。

1 材料与方法

1.1 材料来源、取样方法和居群划分标准

根据地理位置的自然隔离 ,将水杉的子遗分布区划分为 6 个居群 ,个体在 10 株以下的居群全部取样 :即重庆石柱黄水国家森林公园的 1 株作为 1 个居群 ,湖北利川水杉母树管理站分为小河、兴国、桂花、钟岭 4 个居群 ,湖南龙山洛塔自然保护区的 3 株个体作为 1 个居群 ;人工栽培区的美国密西根州作为 1 个居群 ,武汉作为 1 个居群。为保证样本为原生古树和取样的均一度 ,根据水杉胸径总生产量和年龄间的关系回归曲线 : $D = -4.3046 + 1.5032y$ (D 为胸径 , y 为年龄 ,相关系数 $r = 0.8960$)^① 算出树龄在 53 年以上的水杉树胸径必须大于 75 cm(以防止所采的样是 1947 年后人工栽培的水杉) ,利川境内胸围在 250 cm 以上的大树 250 多株(资料由小河水杉管理站提供) ,按照居群大小进行均匀取样(见表 1)。为保证重复取样的准确性 ,对每株样树照相、测量其高和胸径、记录其生境并钉铁牌编号登记。2000 年 1 月取水杉的休眠枝 ,用湿报纸包裹后带回温室扦插使其萌发新枝 ,然后剪取新枝用蒸馏水洗净 ,擦净叶片上的水珠后放入硅胶干燥保存 ;直接剪取的新枝用蒸馏水洗净、擦净叶片上的水珠后存于 -20℃ 冰箱中备用。

1.2 总 DNA 提取与检测

用 CTAB 方法(Whittaker *et al.* , 1997)进行改良提取水杉的总 DNA ,用紫外分光光度计(Eppendorf Biophotometer , Germany)检测 DNA 模板的浓度 ,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、紫外灯下观察照相 ,电泳结果 DNA 带清晰、无拖尾现象表明 DNA 质量较好。

1.3 引物的筛选

用 OPeron 公司 200 条随机引物(10 bp) , 25 μl

①李建华 , 1986. 中国特产的水杉群落. 华中师范大学硕士学位论文.

表 1 水杉采样的位置及生境
Table 1 The habitats and localities of the samples of *M. glyptostroboides*

居群 Population	产地 Locality	原生母树数 No. of natural trees	生境 Habitat	采样数 Sample size	海拔 Altitude(m)
子遗居群 Relict population :					
小河(XH) Xiaohe	湖北利川市小河乡 Xiaohe ,Lichuan ,Hubei	69	桂竹林、庭院、沟边混交林、稻田边 Bamboo forest , yard , mixed forest by streams , and by rice fields	13	1090
桂花(GH) Guihua	湖北利川市桂花乡 Guihua ,Lichuan ,Hubei	81	沟边混交林、庭院、竹林、稻田边 Mixed forest by streams , yard , bam- boo forests , and by rice field	16	1140
钟岭(ZL) Zhongling	湖北利川市钟岭区 Zhongling ,Lichuan ,Hubei	10	路边、庭院 Roadsides and yard	2	1200
兴国(XG) Xingguo	湖北利川市兴国乡 Xingguo ,Lichuan ,Hubei	33	沟边混交林、稻田边 Mixed forest by streams and by rice field	8	1100
洛塔(HN) Luota	湖南龙山县洛塔乡 Luota ,Longshan County ,Hunan	3	山坡、稻田边 Hillsides and by rice field	2	890
黄水(CQ) Huangshui	重庆石柱县黄水 Huangshui , Shizhu County , Chongqing	1	山脚公路边 By highway at hillfoot	1	1560
人工居群 Cultivated population :					
武汉(WH) Wuhan	武汉大学 Wuhan University , Hubei , China		校园栽培 Cultivated plants	2	31
密西根(MG) Michigan	美国密西根州立大学 Michigan State University , USA		栽培 Cultivated plants	4	

的反应体系进行扩增筛选 ;每条引物用 3 个不同居群的模板再加 1 个灭菌双蒸水作空白对照 ,将扩增带清晰、多态性强、稳定、重复性好的 16 条引物用于全部水杉 DNA 样品的扩增 ,即 :OPA7、OPB4、OPB6、OPB10、OPB15、OPF2、OPF3、OPF5、OPG3、OPG6、OPG9、OPG13、OPG16、OPG18、OPK12、OPT20。

1.4 PCR 扩增及产物检测

用筛选好的 16 条随机引物(10 bp)对全部的水杉的样品 DNA 进行 PCR 扩增。基因组 DNA 根据所测浓度稀释至 50 ng/μl 作为模板。反应总体积为 25 μl ,其中 10 × PCR Buffer(Mg²⁺ plus)2. 5 μl , dNTP Mixture(各 2. 5 mM) 1 μl ,TakaRa Taq (5 u/μl)0. 2 μl , 5 μM Primer 1 μl ,模板 DNA (50 ng) 1 μl ,灭菌双蒸水 19. 3 μl ,上述 PCR 扩增液除 Primer 为 OPeron 公司以外 ,其他均为宝生物工程(大连)有限公司的产品。扩增在 Perkin Elmer PCR system 9600 上进行 ,扩增程序为 :94℃ 预变性 2 min ,接 40

个循环 ,每个循环 94℃ 0. 5 min ,35℃ 1 min ,72℃ 1. 5 min ,再接 72℃ 5 min ,然后反应终止在 4℃ 10 min。

扩增产物检测 :扩增产物采用 2% 琼脂糖(Pro-mega)凝胶电泳 ,每隔 15 个样品加 1 个 DNA 标准样品 Marker(100 bp DNA Ladder ,分子量范围 100 ~ 3000 bp ,购自 MBI 公司)。电泳缓冲液为 1 × TAE ,在 BioRAD 电泳仪上进行 3 V/cm(100V)恒定电压下电泳约 3 小时 ,EB 中染色 40 min ,蒸馏水中脱色 2 小时 ,UVP Polaroid 紫外观测仪上观察照相。

1.5 数据统计与分析

电泳图谱中根据分子量标准对照反应产物在胶上对应位置 ,估计扩增产物和分子量的大小(如 OPG9-3-900 bp) ,有带的记为 1 ,无带的记为 0 ,形成 0/1 矩阵图输入计算机 ,采用 POPGENE Version 1. 31 软件(Francis & Yang ,1999)计算出水杉各个居群的 Nei's 基因多样性指数(*H*)、Shannon's 多态性信

息指数(I)、多态位点百分率(PPL)、基因分化系数(G_{st})、居群内基因多样性(H_s)、居群间基因多样性(D_{st})及 Nei's 遗传一致度和遗传距离 ;用 NTSYSpc Version 2.10 (Rohlf , 1994)根据水杉居群的遗传一致度和单株的相似系数 ,对水杉居群和单株进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 水杉的 RAPD 遗传多样性

通过 16 条随机引物(10 bp)对子遗植物水杉 6 个子遗居群 42 个个体和 2 个人工居群 6 个个体的 DNA 样品进行 RAPD 分析 ,共检测到 57 个位点 ,每个引物产生 1 ~ 10 个位点 ,位点分子量范围均在 250 ~ 2000 bp 之间 ,其中 22 个为多态位点 ,占 38.6% , Nei's 基因多样性 $H = 0.1309$,Shannon's 多态性信息指数 $I = 0.1923$ 。子遗水杉居群多态位点百分比率在 10.53% ~ 33.33% 之间 ,多态位点百分比率最低的是湖南龙山洛塔(10.53%) ,多态位点百分比率高的有湖北利川的桂花和小河 2 个居群(33.33% 、31.58%)。 Nei's 基因多样性为 0.0469 ~ 0.1288 和 Shannon's 多态性信息指数为 0.0685 ~ 0.1874 , Nei's 基因多样性和 Shannon's 多态性信息指数的大小与各居群多态位点百分比率的大小趋势一

致。值得注意的是 ,美国密西根州和中国武汉 2 个人工居群多态位点百分比率分别为 10.53% 和 8.77% ,远低于子遗居群的平均水平 ;在龙山洛塔(HN)和湖北武汉(WH)居群多态位点百分比率都是 10.53% 的情况下 ,龙山洛塔(HN)的 Nei's 基因多样性和 Shannon's 多态性信息指数均比湖北武汉(WH)居群的要大(见表 2)。

2.2 水杉子遗居群遗传变异的分析

根据遗传多样性水平在居群内(H_s)、居群间的分化(D_{st})和居群间遗传差异在总遗传差异中所占比例(G_{st}) (见表 3)可知 :总基因多样性 $H_t = 0.1054$ 大于居群内基因多样性($H_s = 0.0940$) ,表明遗传变异主要存在于居群内 ;基因分化系数 $G_{st} = 0.1082$,表明居群间有一定的遗传变异 ,占总遗传变异的 10.82% 。

2.3 遗传距离与聚类分析

小河(XH)与桂花(GH)的子遗居群之间遗传距离最小($D = 0.0066$) ,利川钟岭(ZL)与重庆石柱黄水(CQ)之间的遗传距离最大($D = 0.1493$) ,子遗居群之间的平均遗传距离 $D = 0.080827$,说明子遗居群间存在一定的遗传差异。这可能是由于地理位置近 ,基因交流频率高 ,而地理位置远或山的屏障使基因流在一定程度上受阻造成。为研究距离对子

表 2 水杉子遗居群和人工居群的遗传变异
Table 2 Genetic variation of five relict and two cultivated populations of *M. glyptostrobooides*

居群 Population	个体数 No. of samples	总位点数 Total number of loci	多态位点数 No. of poly-morphic loci	多态位点 百分比率 PPL	Nei's 基 因多样性 H	Shannon's 指数 I
子遗居群 :Relict populations :						
利川小河(XH)	13	57	19	33.33	0.1288	0.1874
标准差 Standard deviation					0.2017	0.2861
利川桂花(GH)	16	57	18	31.58	0.1268	0.1848
标准差 Standard deviation					0.1977	0.2832
利川兴国(XG)	9	57	16	28.07	0.1055	0.1546
标准差 Standard deviation					0.1870	0.2663
利川钟岭(ZL)	2	57	9	15.79	0.0654	0.0955
标准差 Standard deviation					0.1524	0.2225
龙山洛塔(HN)	2	57	6	10.53	0.0469	0.0685
标准差 Standard deviation					0.1325	0.1934
总计 Total	42	57	22	38.60	0.1305	0.1921
标准差 Standard deviation					0.1994	0.2826
人工居群 :Cultivated populations :						
密西根州(MG)	4	57	5	8.77	0.0345	0.0503
标准差 Standard deviation					0.1188	0.1694
湖北武汉(WH)	2	57	6	10.53	0.0436	0.0637
标准差 Standard deviation					0.1282	0.1872

PPL = The percentage of polymorphic loci ; H = Nei's gene diversity ; I = Shannon's information index.

表 3 水杉子遗居群(42 个个体) 中基因多样性 Nei's 分析
Table 3 Nei's analysis of gene diversity in relict populations (42 individuals)

	总基因多样性 H_t	居群内基因多样性 H_s	基因分化系数 G_{st}
平均 Mean	0.1054	0.0940	0.1082
标准差 Standard deviation	0.0543	0.0214	

H_t = total gene diversity ; H_s = gene diversity within populations ; G_{st} = the coefficient of gene differentiation.

图 1 水杉居群间的 Nei's 遗传一致度 UPGMA 聚类图
Fig. 1 Dendrogram of UPGMA based on Nei's genetic identity of the six relict and two cultivated populations of *M. glyptostrobooides*. Population codes are given in Table 1.

遗水杉遗传结构的影响 , 对各子遗居群间的地理距离和遗传距离进行了 Mantel 检验 , 结果是 : 地理距离与遗传距离之间没有显著相关性 , 相关系数 ($r = 0.23466$, $P = 73.27\%$) ($P(\text{random } Z < \text{observed } Z)$, $P > 95\%$ 为显著相关 , $P > 90\%$ 为弱显著相关) 。居群 UPGMA 聚类分析结果 (图 1) 表明 , 湖北利川钟岭 (ZL) 与重庆石柱黄水 (CQ) 之间的遗传距离最大 , 实际上湖北利川钟岭与湖南龙山居群相距一百多公里而与重庆石柱居群相距仅二十多公里 , 这反映了遗传距离与地理距离之间不呈显著相关。但同处于湖北利川的小河 (XH) 、桂花 (GH) 、兴国 (XG) 、钟岭 (ZL) 4 个居群遗传距离最小、地理距离也最近 (相互之间仅几公里至十几公里) , 它们首先聚在一起 , 反映了遗传距离与地理距离之间又存在一定的相关性。人工栽培居群先跟湖北利川 4 个居群聚在一起然后再与重庆石柱和湖南龙山居群相聚 , 表明栽培居群的水杉是湖北利川水杉的后裔。

单株 UPGMA 聚类 (图 2) 显示 , 美国密西根州 4 个个体聚在一起 , 再与桂花个体相聚 , 这进一步证实了栽培居群的水杉是湖北利川水杉的后裔。同一居群的植株并不首先聚在一起 , 而是聚得比较分散 , 推

测这与子遗水杉居群间基因交流有关。
本实验在计算水杉子遗居群的 PPL 、 H 、 I 时 , 由于重庆石柱黄水 (CQ) 仅 1 株 , 故未将其列入。

3 结论

子遗植物水杉是一个古老树种 , 具有寿命长、风媒传粉、种子细小扁平且具翅靠风力传播的特点。理论上 , 水杉应具有较高的遗传多样性。然而本实验显示水杉 $PPL = 38.6\%$, 接近银杉 (*Cathaya argyrophylla*) 的 PPI (32%) (汪小全等 , 1997) , 在松柏目中处于较低水平 , 该值比李春香等 (1999) 所做的水杉 RAPD 实验结果 $PPL = 53\%$ 低。水杉遗传多样性水平低 , 可能与第四纪冰川时期的气候变化有关 : 冰川期极端寒冷的气候条件导致水杉居群数量大为减少及由此造成的瓶颈效应直接影响了现代水杉基因库的规模。第四纪冰川使得原来广布于北半球的水杉的分布区急剧缩小 , 大量的水杉因为不能抵御冰川的作用而灭绝 , 一部分抗性较强的水杉被压迫迁移到湖北、湖南和重庆交界的地域得以最终保存下来 , 它们代表和保存了原始水杉的部分基因型。

图 2 水杉单株间的 Nei's 遗传一致度 UPGMA 聚类图
Fig. 2 Dendrogram of UPGMA based on Nei's genetic identity of the 48 trees of *M. glyptostroboides*
Population codes are given in Table 1.

水杉子遗居群间基因分化系数 $G_{st} = 0.1082$,表明遗传变异部分存在于居群之间 ;而水杉同工酶研究表明水杉群体间的变异为 8.6%(张文英 ,李明鹤 ,1994)。这种差异可能与分子标记方法的不同有关 ,通常认为 RAPD 方法比同工酶方法能检测

出更多的遗传变异(Esselman *et al.* , 1999)。水杉种子存在大、中、小不同生态类型的差异(Li ,1999) 以及湖南居群的叶片微型态结构不同于其他居群 (Yang ,1999)也印证了这点。因此我们在制定水杉遗传资源保育策略时 ,必须考虑相应的采样策略以

图3 引物 OPG-9 对水杉样品的 RAPD 扩增谱带
Fig.3 RAPD bands of *Metasequoia glyptostroboides* samples amplified with primer OPG-9
Lanes 1 ~ 14 belong to population XH ; lane 15 to MD ; lanes 16 ~ 28 and 31 to GH ; lanes 29 ~ 30 to ZL ; lanes 32 ~ 42 to XG ; lanes 43 ~ 44 to LT ; lane 45 to HS (i. e. CQ 42 in Fig. 2). M : DNA ladder (100 ~ 3000 bp).

免丢失居群内与不同居群所保存下来的遗传变异。

人工居群多态位点百分比率仅为 10.53% 和 8.77% ,远低于子遗居群的平均水平 ,虽然这可能与样本数偏少有关 ,但不能不警示我们 :虽然广为栽培的水杉在数量上和分布范围上都是可观的 ,但它们都是来自我国利川有限的水杉母树。如单株聚类分析表明 ,栽培于美国密西根州立大学校园内的 4 株可

能来自相同的繁殖体或亲缘关系十分相似的繁殖体 ,这些栽培水杉所含的遗传多样性是有限的。由于当时在引种栽培时没有现代的遗传学理论作指导 ,每一个栽培区都只能涵盖有限的水杉遗传多样性。

水杉子遗居群多态位点百分比率最低的是湖南龙山洛塔(10.53%) ,多态位点百分率高的有湖北利川的桂花和小河 2 个居群(33.33%、31.58%)。可能与这些子遗居群的小生境和原生母树所具有的基因型有关 ,与样本数也可能有一定的关系 ;利川的小河和桂花 2 个居群拥有约 80% 原生水杉 ,无疑是子遗水杉的分布中心 ,保留了较多的由于第四纪冰川作用汇集在此的水杉的不同基因型。小河、桂花的河流两边农田中发现了大量的水杉阴沉木树兜 ,这说明河两岸的潮湿沙质壤土原来应是水杉最适分布区 ,但由于近几百年来人口大量迁入 ,将河的两岸开垦成水稻田 ,只剩下那些大而易搬动的树兜永埋地下作为历史的见证。这些水杉阴沉木和树兜有力地证明这里原先是大片的水杉森林。实验结果也证实 ,小河和桂花 2 个居群的水杉遗传多样性水平较高 ,洛塔居群遗传多样性水平较低 ,特别是洛塔仅有原生水杉 3 株、黄水和利川谋道分别仅有原生水杉 1 株 ,且各居群相隔甚远 ,生境单一。

虽然水杉子遗居群间基因交流比较频繁 ,能够防止由遗传漂变引起的遗传分化 ,但实地考察的情况却不容乐观 :原生水杉在湖南龙山县只有 3 株 ,四川石柱县只幸存 1 株 ,磨刀溪有模式标本树 1 株 ,大部分原生水杉分布在湖北利川。当地保护部门只重视对水杉原生古树的保护 ,而忽视其生境的保护 ,造成生境片段化严重 ,现有水杉生境下已找不到水杉自然更新幼苗(Bartholomew *et al.* ,1983 ;李建华 ,班继德 ,1989) ,不利于水杉进行基因交流和水杉的繁衍生息 ;加之由于自然死亡及煤烟污染、自然灾害(雷击、风倒、水冲等)和盗伐等原因 ,原生母树数量近几十年来下降很快。探讨如何有效地保存水杉原生母树的遗传资源已迫在眉睫。

在保育生物学中 ,居群遗传学研究和生态学研究应是相互补充的 ,它能使保育生物学家更好地认识濒危物种的生物学特性并制定有效的保育计划(黄宏文 ,1998)。水杉集中分布区的湖北利川小河、桂花两乡是水杉最适分布区 ,在 20 世纪四五十年代 ,人们在两地的水杉林下发现了一些水杉小苗

(郑万钧 ,曲仲湘 ,1949 ;Chu & Cooper ,1950) ,证明两地当时的生境条件是能使水杉在其自然条件下完成其生活史的 ,因此是重建水杉遗传多样性的保存地的最好选择。

根据原生水杉遗传多样性和现有水杉子遗居群的遗传结构及现状 ,根据郑万钧和曲仲湘(1949)所调查的水杉混交林群落结构重建水杉遗传多样性的保存地生态系统 ,建议将 254 株原生母树分别采种育苗按要求定植于小河或桂花(无种子的采用嫁接 ,每棵苗的来源需建立资料档案) ,有利于这些原生母树充分进行基因交流 ,最大限度地保护现存原生水杉古树的遗传多样性。考虑到谋道、黄水和洛塔三地仅有 5 株原生水杉 ,可将这 5 株树按照珍稀古木的形式保护下来 ,然后采下种子播种到小河或桂花等遗传多样性高的居群 ,这种将遗传多样性较低但又包含特有基因类型的类群迁移到遗传多样性高的健康居群中的做法 ,有利于地方稀有基因的保存 ,且经济有效 ,有利于包含不同基因类型的水杉在一起进行基因交流 ,从而育出适应性更强的水杉类型 ,更有效地保存水杉的遗传多样性。

致 谢 本实验在中国科学院武汉植物研究所植物保育遗传学重点开放实验室完成。中国科学院南京地质古生物研究所李春香提供有关资料。在野外采样中得到湖北利川小河水杉母树管理站范深厚、重庆石柱县林业局谭千吉、湖南龙山县洛塔自然保护区刘德岚、中国科学院武汉植物研究所赵子恩和王恒昌的帮助。中国科学院武汉植物研究所李作洲协助读带和计算。特致谢忱。

参考文献

Bartholomew B. , Boufford D. E. and Spongberg S. A. 1983. *Metasequoia glyptostrobodes* —Its status in central China in 1980. *Journal of the Arnold Arboretum*, **64**: 105 – 128.

Cheng W-C(郑万钧) and Chu Z-X(曲仲湘). 1949. Forest present of *Metasequoia glyptostroboides* in Lichuan, Hubei. *Science in China(科学)*, **31**(3): 73 – 80. (in Chinese)

Chu K. L. and Cooper W. C. 1950. An ecological reconnaissance in the native home of *Metasequoia glyptostroboides*. *Ecology*, **31**: 260 – 278.

Esselman E. J. , Li J. Q. , Crawford D. , Winduss J. L. and Wolfe A. D. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for

allozymes and random amplified polymorphic DNA(RAPD) and intersimple sequence repeat(ISSR) markers. *Molecular Ecology*, **8**: 443 – 451.

Fulling E. H. 1976. *Metasequoia*: fossil and living. *The Botanic Review*, **42**: 215 – 315.

Francis C. Y. and Yang R. C. POPGENE VERSION 1. 31. , August 1999.

Hu H. H. and Cheng W. C. 1948. On the new family Metasequoiaceae and on *Metasequoia glyptostroboides*, a living species of the genus *Metasequoia* found in Szechuan and Hupeh. *Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology, New Series*, **1**(2): 153 – 161.

Hu H. H. 1948. How *Metasequoia*, the “living fossil” was discovered in China. *The Journal of the New York Botanical Garden*, **49**(585): 201 – 207.

Huang H-W(黄宏文). 1998. Conservation genetics and strategy for plant genetic resources. *Journal of Wuhan Botanical Research(武汉植物学研究)*, **16**(4): 346 – 358. (in Chinese)

Kuser J. E. , Sheely D. L. and Hendricks D. R. 1997. Genetic variation in two *ex situ* collections of the rare *Metasequoia glyptostroboides* (Cupressaceae). *Silvae Genetica*, **46**(5): 258 – 264.

Li C-X(李春香), Yang Q(杨群), Zhou J-P(周建平), Fan S-H(范深厚) and Yang H(杨洪). 1999. RAPD analysis of genetic diversity in the natural population of *Metasequoia glyptostroboides*, Central China. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (Natural Science Version) [中山大学学报(自然科学版)], **38**(1): 59 – 63. (in Chinese)

Li J-H. 1999. *Metasequoia*: an overview of its phylogeny, reproductive biology, and ecotypic variation. *Arnoldia*, **58**(4)/**59**(1): 54 – 59.

Li J-H(李建华) and Ban J-D(班继德). 1989. The water fir communities endemic to China. *Journal of Henan Normal University*(Natural Science Version) [河南师范大学学报(自然科学版)], **4**: 49 – 55. (in Chinese)

Li L-C(李林初). 1986. Karyotype study of *Metasequoia glyptostroboides*. *Journal of Wuhan Botanical Research(武汉植物学研究)*, **4**(1): 1 – 7. (in Chinese)

Ling H. (林协). 1976. The living fossil——The past and the present *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng. *Acta Phytotaxonomica Sinica*(植物分类学报), **14**(2): 51 – 54. (in Chinese)

Miki S. 1941. On the change of flora in eastern Asia since the Tertiary. *Journal of Japanese Botany*, **11**: 237 – 303.

Merrill E. D. 1948. *Metasequoia*, another “ living fossil ”. *Journal of Anorlrd Arboretum*, **8**(1): 1 – 8.

Rohlf F. J. 1994. NTSYS-PC. Version 2. 10, Appllied Biosta-

tistics Inc., New York

Stebbins G. L. 1948. The chromosomes and relationship of *Metasequoia* and *Sequoia*. *Science*, **108**: 95 – 98.

Satoh K. 1999. *Metasequoia* travels the globe. *Arnoldia*, **58** (4)/**59**(1): 72 – 75.

Sze H-C(斯行健). 1951. On the cuticular structure of *Metasequoia*. *Science in China*(中国科学), **2**(2): 239 – 243. (in Chinese)

Wang F. H.(王伏雄) and Chien N. F.(钱南芬). 1964. The embryogeny of *Metasequoia glyptostroboides*. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), **12**(3): 241 – 251. (in Chinese)

Wang X-Q, Zou Y-P, Zhang D-M, Hong D-Y and Liu Z-Y. 1997. Genetic diversity analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang. *Science in China*(C), **40**(2): 145 – 151.

Whittaker D. J., Smith G. S. and Gardner R. C. 1997. Expression of ethylene biosynthetic genes in *Actinidia chinensis* fruit. *Plant Molecular Biology*, **34**(1): 45 – 55.

Yang H. 1999. From fossils to molecules: the *Metasequoia* tale continues. *Arnoldia*, **58**(4)/**59**(1): 60 – 71.

Zhang W. Y.(张文英) and Li M. H.(李明鹤). 1994. A study on genetic variation of isozyme in *Metasequoia glyptostroboides*. *Journal of South China Agricultural University*(华南农业大学学报), **15**(2): 118 – 123. (in Chinese)

(责任编辑 : 时意专)