2014-06-25 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2014.11033 http://www.cibj.com/
应用与环境生物学报 *Chin J Appl Environ Biol* 2014, **20**(3): 443-448

长柄石杉不同地理居群叶绿体DNA *trnL-trnF* 序列变异与聚类分析*

宋育红[1,2] 张君诚[1,2**] 张杭颖[1,2]
[1]三明学院应用生物技术研究所 三明 365004
[2]复旦大学-三明学院天然药物工程研究中心 三明 365004

摘 要 采用直接测序法，对石杉科广布种长柄石杉（*Huperzia serrata* var. *longipetiolata*）21个居群（福建省19个居群和江西省2个居群）共计126株个体的叶绿体DNA *trnL-trnF*序列进行测序，用Clustal X和MEGA5.0软件进行序列分析，UPGMA法构建聚类图，以期了解序列变异与地理分布的关系，为长柄石杉资源的保护及开发利用提供参考依据. 扩增获得的序列全长在928-967 bp之间，经排序后两端切平，序列长925 bp，G + C平均含量为34.05%；21个长柄石杉居群的cpDNA *trnL-trnF* 序列存在20个变异位点，5个信息位点. UPGMA聚类结果显示，福建省居群与江西居群存在较大遗传距离，分聚为不同分支；福建省内19个居群再分聚为3个分支，其中11个居群间的遗传距离为零. 研究结果表明长柄石杉居群间存在较明显的遗传分化和一定强度的基因流，居群间的叶绿体DNA *trnL-trnF*序列变异与地理分布尤其是山脉形成的隔离和屏障有关，较高的遗传多样性和基因流水平有利于长柄石杉种群的生存与进化. 图2 表3 参23

关键词 长柄石杉；地理居群；*trnL-trnF*序列；聚类分析；遗传多样性；基因流
CLC Q949.360.3

Analysis of cpDNA *trnL-trnF* sequences of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata* of different geographical populations*

SONG Yuhong[1,2], ZHANG Juncheng[1,2**] & ZHANG Hangying[1,2]
[1]*Institute of Applied Biotechnology, Sanming University*, Sanming 365004, China
[2]*Fudan University-Sanming University Natural Medicine Engineering Research Center*, Sanming 365004, China

Abstract This study aimed to investigate the relationship between the variation of chloroplast DNA (cpDNA) *trnL-trnF* gene sequences and the geographical origins of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata*, so as to provide reference basis for its protection and utilization. PCR direct sequencing was applied to detect the chloroplast DNA *trnL-trnF* gene sequences of 126 samples collected from 21 populations (19 in Fujian and 2 in Jiangxi) of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata*. Then sequence analysis was performed by means of Clustal X and MEGA 5.0. The cluster diagram was constructed by UPGMA method. The length of *trnL-trnF* of all samples was 928 - 967 bp; the aligned sequence length was 925 bp; and the average content of G + C was 34.05%. There were 20 variable sites and 5 informative sites in these sequences. The cluster diagram by UPGMA method showed great variance between Fujian and Jiangxi geographical populations, which should be classified as different clusters. The 19 populations in Fujian were divided into three clusters, 11 of them with no genetic distance. The results indicated that genetic differentiation and gene flow of the populations of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata* are in relatively high level, which is beneficial to the survival and evolution of the populations. The variation of *trnL-trnF* sequence of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata* populations is related to their geographical distribution, especially related to the isolation of mountain ranges.

Keywords *Huperzia serrata* var. *longipetiolata*; geographical population; *trnL-trnF* sequence; clustering analysis; genetic diversity; gene flow

收稿日期 Received: 2013-11-17 接受日期Accepted: 2014-01-13
*福建省科技厅重点科技项目（2010N0027）、福建省教育厅科技项目（JA10263）和福建省高校服务海西重点项目（HX200801）资助
Supported by the Key Sci-tech Project of Fujian, China (2010N0027), the Sci-tech Project of Fujian Provincial Education Department (JA10263), and the Key Project of Fujian Higher Education Institutions Serving for 'Haixi' District (HX200801)
**通迅作者 Corresponding author (E-mail: 5988603101@163.com)

石杉科植物是现今残存的最为古老的蕨类植物类群，为多年生小型草本植物，普遍含有石杉碱甲（Huperzine A）[1]. 石杉碱甲是一种低毒、高效、高选择性的中枢乙酰胆碱酯酶抑制剂，对治疗中老年痴呆具有显著疗效[2]，目前石杉碱甲几乎全部依赖于石杉科范围内的天然来源[3-6]. 我国石杉科植物有2属近50种，其中以长柄石杉分布较广，资源储量最大，是工业化提取石杉碱甲最可能依赖的种类. 近年来，人口老年化加速了石杉碱甲需求的快速增长，导致石杉资源过度采收，加之森林面积减少使其分布区不断收缩，其生境渐呈间断分布的态势[4]，对石杉科植物遗传特点的研究有助于对其资源的保护. 目前对石杉科植物的研究主要涉及生态学与生物学特征、植物化学、繁殖栽培和内生菌等，对其进行分子水平的研究报道较少，主要集中于对石杉科植物系统关系的研究[7-9]，石杉科植物居群地理分布的分子机制研究仅张君诚等利用AFLP标记对武夷山脉长柄石杉居群进行了研究[10]. 同分子标记技术等指纹技术相比，DNA测序能够提供最直接、最可靠的数据，且更易数字化，便于数据的分析、交流和检索[11]. 叶绿体DNA *trnL-trnF*序列属非编码区序列，进化速率快，能提供较多的信息位点，多用于较低分类阶元及近期分化类群间系统发育和种间、品种的鉴别研究[12]，也有研究表明该序列可用于某些类群种间甚至种下居群水平的研究[13]. 长柄石杉是福建省石杉科植物的主要物种，其分布和资源储量均在该科中占优势[14]. 本研究采用直接测序的方法，以江西省的两个居群为参照对福建省全境范围长柄石杉不同地理居群的cpDNA基因序列差异进行研究，探究其居群间的cpDNA*trnL-trnF*序列变异与地理分布之间的相关性，以期为了解长柄石杉遗传特点和资源保护提供分子依据.

1 材料与方法

1.1 植物材料采样

研究对象为福建省长柄石杉的19个自然居群和江西省2个自然居群（表1，图1）. 每两个居群之间至少相隔40 km以上，每个居群取10-20个单株，采样植株的间距20 m以上，以尽可能避免重复采集同一克隆. 分单株编号迅速放入装有变性硅胶的封口袋中，快速干燥，之后转移至超低温冰箱保存备用.

1.2 DNA提取及PCR扩增

采用改良的CTAB法提取叶片总DNA[15]，1.0%琼脂糖电泳检测质量，–20℃保存备用. 扩增cpDNA *trnL-trnF*非编码区引物使用Taberlet等设计的通用引物c(5′CGAAATCGGTAGACGCTACG3′)和f(5′ATTTGAACTGGTGACACGAG 3′)[12]对来自21个居群126个样本的cpDNA*trnL-trnF*序列进行PCR扩增. 引物序列由上海生物工程技术有限公司生产合成. 扩增反应体系为20 μL，包括1 × PCR buffer、200 μmol/L dNTP、0.3 μmol/L引物、2.5 mmol/L Mg^{2+}、1 U Taq DNA聚合酶、40 ng模板DNA；PCR扩增反应在美国产PTC-100型PCR扩增仪上进行，扩增程序：94 ℃预变性4 min；94 ℃变性1 min，61.5 ℃退火1 min，72 ℃延伸1 min，33个循环；72 ℃延伸7 min，4 ℃保存. PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测质量.

表1 长柄石杉居群的地理位置和取样
Table 1 Geographical location and sampling of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata* populations

居群名称（代码） Population (code)	采样点 Locality	地理位置 Geographical location	海拔 Altitude (*h*/m)	取样数（实验数） Sample number (In experiment)
福建屏南 Pingnan, Fujian (PN)	岭下乡 Lingxia Village	27°08′N, 118°95′E	960	20 (6)
福建寿宁 Shouning, Fujian (SN)	坑底乡 Kengdi Village	27°56′N, 119°52′E	1050	16 (6)
福建南平 Nanping, Fujian (NP)	塔前镇 Taqian Town	26°26′N, 118°09′E	910	10 (6)
福建建阳 Jianyang, Fujian (JY)	三宝山 Sanbao Hill	27°26′N, 118°13′E	770	20 (6)
福建光泽 Guangze, Fujian (GZ)	牛田乡 Niutian Village	27°28′N, 117°15′E	820	20 (6)
福建永泰 Yongtai,Fujian (YT)	大洋镇 Dayang Town	25°89′N, 118°85′E	610	10 (6)
福建龙岩 Longyan, Fujian (LY)	新罗区 Xinluo District	25°32′N, 117°01′E	730	20 (6)
福建武平 Wuping, Fujian (WP)	梁野山国家级自然保护区 Liangye Mountain National Nature Reserve	25°20′N, 116°18′E	880	11 (6)
福建漳平 Zhangping, Fujian (ZP)	永福镇 Yongfu Town	25°17′N, 117°25′E	920	20 (6)
福建连城 Liancheng, Fujian (LC)	罗坊乡 Luofang Village	25°71′N, 116°62′E	730	20 (6)
福建南靖 Nanjing, Fujian (NJ)	船厂镇 Shipyard Town	24°19′N, 117°19′E	622	12 (6)
福建华安 Huaan, Fujian (HA)	马坑乡 Makeng Village	25°00′N, 117°43′E	980	12 (6)
福建永春 Yongchun, Fujian (YC)	雪山 Snow Mountain	25°47′N, 118°14′E	950	13 (6)
福建德化 Dehua, Fujian (DH)	戴云山 Daiyun Mountain	25°70′N, 118°10′E	1230	16 (6)
福建建宁 Jianning, Fujian (JN)	闽江源国家级自然保护区 Minjiang Origin National Nature Reserve	26°15′N, 116°39′E	970	20 (6)
福建将乐 Jiangle, Fujian (JL)	龙栖山国家级自然保护区 Longqi Mountain National Nature Reserve	26°72′N, 117°56′E	810	18 (6)
福建宁化 Ninghua, Fujian (NH)	泉上镇 Quanshang Town	26°15′N, 116°39′E	640	20 (6)
福建永安 Yongan, Fujian (YA)	天宝岩国家级自然保护区 Tianbaoyan National Nature Reserve	25°57′N, 117°21′E	740	18 (6)
福建尤溪 Youxi, Fujian (YX)	溪尾乡 Xiwei Village	26°10′N, 118°12′E	700	16 (6)
江西资溪 Zixi, Jiangxi (ZX)	大觉山 Dajue Hill	27°43′N, 117°04′E	430	20 (6)
江西瑞金 Ruijin, Jiangxi (RJ)	梅山顶 Meishan Hill	25°52′N, 116°02′E	690	20 (6)

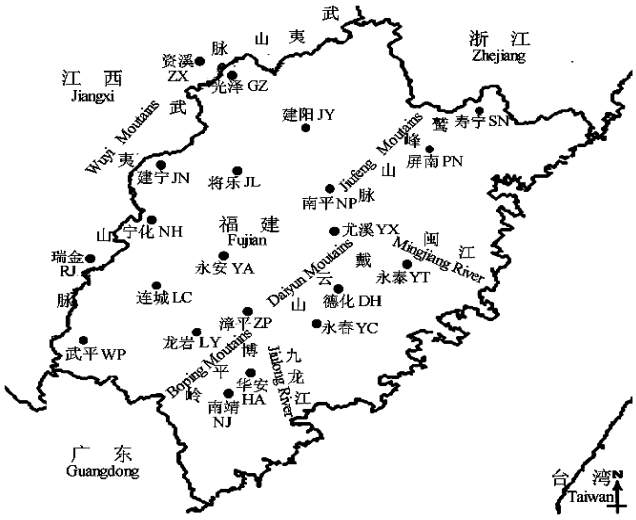


图1 长柄石杉的21个自然居群取样图.

Fig. 1 Sampling location of 21 populations of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata*.

1.3 序列测定

PCR产物的纯化和序列测定由上海申速生物技术有限公司完成. PCR产物直接双向测序, 测序引物与PCR反应引物相同.

1.4 数据处理

用Clustal X软件进行对位排列, 然后手工适当调整, 将变化大, 干扰分析的区段删除. 对位排列后的序列用MEGA5.0软件进行序列间的差异分析, 并在MEGA上基于Nei遗传距离得到UPGMA聚类图,利用bootstrap(1 000次重复)检验各分支的置信度, 空缺(Gap)始终做缺失(Missing)处理.

2 结果与分析

2.1 长柄石杉居群*trnL-trnF*序列特征

测得长柄石杉21个居群的叶绿体基因间隔区*trnL-trnF*序列长度为928-967 bp, 经排序后两端切平, 得到长度为925 bp的整齐序列, 序列碱基组成为A 30.59%, G 18.59%, C 15.46%, T 35.35%; G + C含量为34.05%. 序列结果比对显示福建省内的宁化、光泽、永泰、武平、尤溪、永安、连城、南平、龙岩等9个居群的序列完全一致, 其余12个居群的序列存在碱基差异, 共20个变异位点, 5个信息位点, 分别占序列总长度的2.16%和0.54%. 其中江西居群与福建居群存在较大的碱基差异, 与福建省序列完全一致的9个居群相比, 江西的瑞金居群有6个变异位点, 资溪居群有4个变异位点(表2).

2.2 居群间遗传距离及UPGMA聚类分析

为进一步分析居群间的遗传分化程度, 计算了Nei's遗传距离和碱基差异率, 21个长柄石杉居群间碱基差异率在0-0.006之间, 遗传距离在0-0.008 之间(表3), 居群间的平均遗传距离为0.002 1. 当序列碱基空缺做缺失处理时, 宁化、光泽、永泰、武平、尤溪、永安、连城、南平、龙岩、将乐、建阳等11个居群之间的遗传距离为零. 江西居群与福建居群的遗传距离较大, 江西的瑞金居群与福建居群的遗传距离在0.005-0.008之间, 平均遗传距离为0.005 6; 资溪居群与福建居群的遗传距离在0.003-0.008之间, 平均遗传距离为0.005 5. 居群间遗传距离最大的是瑞金与屏南、瑞金与资溪、屏南与

表2 长柄石杉居群cpDNA *trnT-trnF*序列差异

Table 2 Differences of cpDNA *trnT-trnF* sequences of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata* populations

居群 Population	位点 Site (bp)																			
	13	14	28	29	34	36	40	46	51	57	166	267	658	829	830	831	839	867	889	905
德化 DH	T	A	G	A	-	G	A	G	A	C	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
宁化 NH	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
瑞金 RJ	T	A	C	A	T	G	A	T	A	A	G	T	G	-	-	C	-	A	G	A
将乐 JL	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	T	C	T	C	A	G	A
永春 YC	T	A	G	G	-	G	-	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
建阳 JY	T	A	G	A	-	G	-	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
光泽 GZ	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
华安 HA	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	T
寿宁 SN	C	T	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
南靖 NJ	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	C	-	C	T	-	A	G	T
永泰 YT	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
武平 WP	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
尤溪 YX	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
永安 YA	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
连城 LC	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
漳平 ZP	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	C	G	-	C	T	-	A	G	A
南平 NP	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
屏南 PN	C	T	G	A	-	G	A	G	G	A	C	T	G	T	C	T	-	A	G	A
建宁 JN	T	A	G	A	-	G	A	A	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A
资溪 ZX	T	A	G	A	-	C	A	A	A	A	C	T	G	-	C	T	-	C	A	A
龙岩 LY	T	A	G	A	-	G	A	G	A	A	C	T	G	-	C	T	-	A	G	A

表3 长柄石杉居群间的遗传距离（对角线下）和碱基差异（对角线上）

Table 3 Genetic distances (below diagonal) and base difference (above diagonal) between the populations of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata*

居群 Population	德化 DH	宁化 NH	瑞金 RJ	将乐 JL	永春 YC	建阳 JY	光泽 GZ	华安 HA	寿宁 SN	南靖 NJ	永泰 YT	武平 WP	尤溪 YX	永安 YA	连城 LC	漳平 ZP	南平 NP	屏南 PN	建宁 JN	资溪 ZX	龙岩 LY
德化 DH		0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.005	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.006	0.001	0.002	0.001
宁化 NH	0.001		0.002	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.005	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
瑞金 RJ	0.006	0.005		0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.006	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.006	0.002	0.003	0.002
将乐 JL	0.001	0.000	0.005		0.001	0.000	0.000	0.001	0.005	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
永春 YC	0.002	0.001	0.006	0.001		0.001	0.001	0.001	0.005	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.006	0.002	0.003	0.001
建阳 JY	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001		0.000	0.001	0.005	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
光泽 GZ	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001	0.000		0.001	0.005	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
华安 HA	0.002	0.001	0.006	0.001	0.002	0.001	0.001		0.005	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.006	0.001	0.003	0.001
寿宁 SN	0.003	0.002	0.007	0.002	0.003	0.002	0.002	0.003		0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.001	0.006	0.006	0.005
南靖 NJ	0.003	0.002	0.007	0.002	0.003	0.002	0.002	0.001	0.005		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.006	0.002	0.003	0.001
永泰 YT	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002		0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
武平 WP	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.000		0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
尤溪 YX	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.000	0.000		0.000	0.000	0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
永安 YA	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000		0.000	0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
连城 LC	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000		0.001	0.000	0.006	0.001	0.002	0.000
漳平 ZP	0.002	0.001	0.006	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		0.001	0.006	0.001	0.003	0.001
南平 NP	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001		0.006	0.001	0.002	0.000
屏南 PN	0.005	0.003	0.008	0.003	0.005	0.003	0.003	0.005	0.001	0.006	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003		0.006	0.006	0.006
建宁 JN	0.002	0.001	0.005	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.005		0.002	0.001
资溪 ZX	0.006	0.005	0.008	0.005	0.006	0.005	0.005	0.006	0.007	0.007	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.005	0.008	0.003		0.002
龙岩 LY	0.001	0.000	0.005	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.003	0.001	0.005	

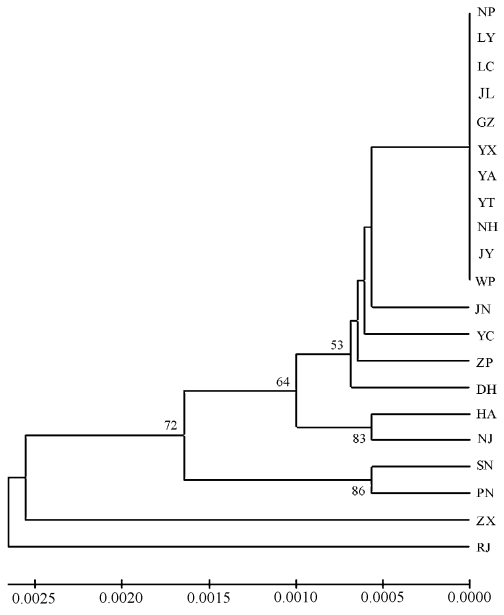


图2 长柄石杉21个居群基于*trnL-trnF*序列的UPGMA聚类图. 分支处数字代表1 000次重复的支持率，大于50%在图中显示.

Fig. 2 UPGMA dendrogram for 21 populations of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata* based on cpDNA *trnT-trnF* sequences. Numbers at the nodes represent bootstrap supported from 1 000 replicates, only values above 50% shown.

资溪居群，遗传距离均达0.008.

采用UPGMA聚类法，获得长柄石杉居群的*trnL-trnF*序列系统聚类图（图2）. 聚类结果显示，21个长柄石杉居群首先聚为3支：江西的瑞金、资溪居群各自单独形成1支，福建居群聚为1支；福建居群再分聚为3个分支，福建东北部（寿宁、屏南）居群和东南部（华安和南靖）居群分别聚为一支，其余15个居群聚为一支（图2）.

福建省与江西省的自然地理分界线是绵亘的武夷山脉，自然地理的阻隔使江西长柄石杉居群与福建居群的基因交流困难，所以江西居群（瑞金、资溪）与福建居群存在较大的碱基差异和遗传距离，聚类时与福建居群分聚为不同分支. 江西的瑞金、资溪居群分别位于武夷山脉的南段和北段，二者地理距离遥远，限制了基因交流，遗传分化增大，因此分聚为两支.

福建省19个居群分聚为3个分支，聚为大分支的15个居群中，有11个居群（南平、龙岩、连城、将乐、光泽、尤溪、永安、永泰、宁化、建阳、武平）聚为彼此遗传距离为零的一个分支，其余4个居群（建宁、永春、漳平、德化）间存在一定的遗传距离（图2）. 福建省主要山脉有绵亘西北边界的武夷山脉和从北向南纵贯福建中部的三大山脉，依次为鹫峰山脉、戴云山脉和博平岭山脉（图1），彼此间遗传距离为零的11个居群，除永泰居群外，地理位置均位于武夷山脉至三大山脉之间的丘陵地带，地理阻隔不明显时，能聚为遗传距离为零的一个分支，说明居群间存在较高水平的基因流，这与“对于广布种来说，居群间遗传分化比较小，基因流频率比较高”的观点[16]相符合的，因此可以认为地处福建省武夷山脉和三大山脉之间的长柄石杉居群连通性较强. 永泰居群位于戴云山脉北段起始端东侧，其基因流未受到山脉的阻隔，因

此与彼此间遗传距离为零的居群聚为一支. 其余4个居群(建宁、永春、漳平、德化)间存在一定的遗传距离可能与其附近高山的阻隔作用有关: 建宁居群东临峨嵋峰、漳平居群西北面有玳瑁山、永春和德化居群西北侧有戴云山脉的阻隔, 使得这4个居群与其它居群的基因交流受到一定程度的阻隔, 而产生*trnL-trnF*序列基因的差异, 导致居群间遗传距离的产生.

位于福建东北部的寿宁、屏南居群和东南部的华安、南靖居群分别各聚为一支, 这与其所处的独特地理位置有关(图1). 福建东北部的寿宁、屏南居群西面有鹫峰山脉的阻隔, 东面临海, 南面有福建最大江河闽江的阻隔, 限制了寿宁、屏南居群与其它居群的基因交流, 遗传漂变使得这两居群与其它居群的遗传距离增大. 同理, 位于福建东南部的华安、南靖居群, 西面有博平岭山脉的屏障作用, 北面受到福建第二大河流九龙江的阻隔, 东邻大海, 限制了居群与外界的基因交流, 小区域范围的种群易发生遗传漂变, 使得华安、南靖居群与其他居群存在较大的遗传距离. 聚类结果可以看出长柄石杉居群分化具有明显的地理区域性, 居群间的叶绿体DNA *trnL-trnF*序列变异与地理分布, 尤其是山脉形成的隔离和屏障有关.

3 讨论

叶绿体基因组作为独立的遗传单位, 不经历遗传重组, 受到的选择压力小, 能直接反映植物在长期的进化过程中积累的遗传变异[17], 特别是其非编码区段, 由于具有较快的进化速率, 在分子水平上有较明显差异, 且在序列和结构上都相对保守, 可为生物多样性研究提供可靠和准确的信息, 特别是对于较近分类群及地理种群的研究具有重要价值[18]. 叶绿体基因组中的*trnL-trnF*基因间隔区(IGS)是非编码的序列, 演化速率比较快, 已被一些学者用于种下居群水平的研究[11, 19-20]. 不同的叶绿体基因进化速度和活跃度不同, 李春香等对5种星蕨属(*Microsorium*)植物叶绿体基因组中的*rbcL*、*rps4*基因和*trnL-trnF*、*rps4-trnS*基因间隔区序列进行分析, 结果5种星蕨属植物的遗传距离范围以*trnL-trnF*基因间隔区的最大[21]. 本研究选择叶绿体*trnL-trnF*序列对石杉科广布种长柄石杉不同地理居群进行分析, 取得较理想的效果, 21个居群的叶绿体*trnL-trnF*序列存在20个变异位点、5个信息位点, 能有效区分出因地理隔离而导致的长柄石杉在居群水平上的差异. 实验结果证实叶绿体基因组中的*trnL-trnF*基因序列适用于长柄石杉居群水平的研究, 而其它叶绿体基因序列是否有更好的研究效果还有待作进一步的研究.

本文研究结果(图2)显示长柄石杉居群分化具有明显的地理区域性, 福建居群与江西居群分聚为不同分支, 福建省内19个居群再分聚为3个分支, 说明调查区域范围内长柄石杉居群间存在较明显的遗传分化, 种群具有较高水平的遗传多样性, 这与福建省的地理特点有关, 绵亘西北边界的武夷山脉阻隔了福建居群与江西居群的基因交流, 而南北走向纵贯福建中部的三大山脉(鹫峰山脉、戴云山脉和博平岭山脉)以及由西向东流向的闽江和九龙江对福建长柄石杉居群间的基因交流起到一定的阻隔作用, 地理隔离导致隔离区域间的居群遗传距离增加产生遗传分化, 所以地理隔离是长柄石杉居群间遗传分化的主要原因. 值得注意的是福建省内位于武夷山脉和三大山脉之间的居群由于地理阻隔不明显, 居群间遗传距离很小, 其中11个居群间的遗传距离为零, 说明长柄石杉居群间存在一定强度的基因流, 这与张君诚等的研究结果[10]一致. 一个物种的进化潜力和抵御逆境的能力取决于种内遗传变异的大小, 遗传多样性越丰富, 对环境变化的适应能力越强[22], 长柄石杉较高的遗传多样性和一定强度的基因流水平, 表明其具有相当的适应环境能力和进化潜力. 葛颂等认为有些特有和濒危物种也可保持较高的变异水平[23], 目前长柄石杉及石杉科其它物种资源日渐枯竭濒危的原因并非由其遗传特点导致的, 生境的破坏丧失和近年来人类无节制的采收是使其种群数量减少致濒的主要原因, 但其较高的遗传多样性和基因流水平对种群的恢复是有利的, 因此, 生境的保护与对石杉科植物资源科学合理的开发利用是使其种群得以恢复的有效途径之一.

参考文献 [References]

1 杨明, 姚志伟, 赵毅民, 栾新慧. HPLC法测定石杉科植物中石杉碱甲的含量[J]. 军事医学科学院院刊, 2000, **24** (2): 123-125 [Yang M, Yao ZW, Zhao YM, Luan XH. HPLC method for the determination of huperzine A content in Huperziaceae [J]. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2000, **24** (2): 123-125]

2 王月娥, 岳东贤, 唐希灿. 石杉碱甲的抗乙酰胆碱酯酶的作用[J]. 中国药理学报, 1986, **7** (2): 110 [Wang YE, Yue DX, Tang XC. Anticholinesterase activity of huperzine A [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1986, **7** (2): 110]

3 Ma XQ, Gang DR. The Lycopodium alkaloids[J]. *Nat Prod Rep*, 2004, **21** (6): 752-772

4 Ma XQ, Tan CH, Zhu DY, Gang DR. Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of Huperziaceae species in China [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, **53**: 1393-1398

5 Ma XQ, Tan CH, Zhu D, Xiao P. Huperzine A from *Huperzia* species- an ethnopharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, **113** (1): 15-34

6 王峻, 潘胜利. 湖南省石杉属植物中石杉碱甲含量的研究[J]. 中国药学杂志, 2005, **40** (21): 1616-1618 [Wang J, Pan SL. Study on content of huperzine A in six plants of *Huperzia* from Hunan province [J]. *Chin Pharm J*, 2005, **40** (21): 1616-1618]

7 姬生国, 潘胜利, 王峻, 霍克克基于叶绿体*mat*K基因序列探讨10种石杉科植物的系统关系及分子鉴定[J]. 中国中药杂志, 2007, **32** (19): 1971-1975[Ji SG, Pan SL, Wang J, Huo KK. Phylogeny relationship and molecular identification of ten *Huperzia* species (Huperziaceae) based on *mat*K gene sequeuces [J]. *China J Chin Mat Med*, 2007, **32** (19): 1971-1975]

8 Ji SG, Huo KK, Wang J, Pan SL. A molecular phylogenetic study of Huperziaceae based on chloroplast rbcL and psbA-trnH sequences [J]. *J Syst Evol*, 2008, **46** (2): 213-219

9 邵浩, 张丽, 吕会芳, 周吉燕, 胡之璧, 黎万奎. 用叶绿体*trnH-psbA*序列分析石杉科植物系统发育和植物条形码的初探[J]. 中药材, 2010, **33**

(1): 18-21 [Shao H, Zhang L, Lv HF, Zhou JY, Hu ZB, Li WK. The utility of *trnH – psbA* gene for phylogenetic analysis of Huperziaceae and plant barcoding [J]. *J Chin Med Mat*, 2010, **33** (1): 18-21]

10 张君诚, 宋育红, 朱勇, 张杭颖, 钟扬. 长柄石杉居群遗传多样性和遗传结构的AFLP分析[J]. 应用与环境生物学报, 2011, **17** (1): 18-23 [Zhang JC, Song YH, Zhu Y, Zhang HY, Zhong Y. AFLP analysis of genetic diversity and population structure of *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. var. *longipetiolata* (Spring) H. M. Chang [J]. *Chin J Appl Environ Biol* , 2011, **17** (1): 18-23]

11 吴娟子, 王强, 钟小仙, 陈建群. 根据cpDNA*trn*T-*trn*F序列变异分析中国互花米草种群的遗传结构[J]. 草业学报, 2012, **21** (4): 134-140 [Wu JZ, Wang Q, Zhong XX, Chen JQ. Analysis of the genetic structure of *Spartina alterniflora* populations in China based on cpDNA *trn*T-*trn*F sequences [J]. *Acta Pratacult Sin*, 2012, **21** (4) : 134-140]

12 Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, **17** (5): 1105-1109

13 Koch MA, Kiefer C, Ehrich D, Vogel J, Brochmann C, Mummenhoff K. Three times out of Asia minor: the phylogeography of *Arabis alpine* L. (Brassicaceae) [J]. *Mol Ecol*, 2006, **15**: 825-839

14 张君诚, 宋育红, 黄晖, 陈建民. 福建三明地区石杉科(Haperziacea)植物群落特征及其生境调查分析[J]. 复旦学报(自然科学版), 2008, 47 (5): 627-632 [Zhang JC, Song YH, Huang H, Zhang HY, Chen JM. Investigation on the feature of Huperziaceae community at Sanming area in Fujian province[J]. *J Fudan Univ*, 2008, **47** (5): 627-632]

15 Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, **19**: 11-15

16 Loveless MD, Hamrick JL. Ecological determinants of genetic structure in plant populations [J]. *Ann Rev Ecol Syst*, 1984, **15**: 65-95

17 Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects [J]. *Mol Ecol*, 1998, **7** (4): 465-474

18 黄璐琦. 分子生药学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006 [Huang LQ. Molecular Pharmacognosy [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2006]

19 金艳蕾, 周涛, 张丽艳, 江维克, 魏升华. 头花蓼不同地理居群的叶绿体*psbA-trnH*和*trnL-trnF*基因序列与聚类分析[J]. 中国中药杂志, 2011, **36** (3): 342-345 [Jin YL, Zhou T, Zhang LY, Jiang WK, Wei SH. Analysis on chloroplast DNA sequences of *Polygonum capitatum* of different geographical population [J]. *China J Chin Mat Med*, 2011, **36** (3): 342-345]

20 苏应娟, 王艇, 郑博, 江宇, 欧阳蒲月, 陈国培, 王伯荪. 根据cpDNA*trnL-F*非编码区序列变异分析黑桫椤海南和广东种群的遗传结构与系统地理[J]. 生态学报, 2004, **24** (5): 914-919 [Su YJ, Wang T, Zheng B, Jiang Y, Ouyang PY, Chen GP,Wang BS. Genetic structure and phylogeography of populations of *Alsophila podophylla* in Hainan and Guangdong, southern China , based on cpDNA *trnL-F* noncoding sequences[J]. *Acta Ecol Sin*, 2004, **24** (3): 914-919]

21 李春香, 陆树刚. 龙骨星蕨与膜叶星蕨的关系: 来自叶绿体 *rbc L*、*rps4* 和 *trn L-trn F*、*rps4-trnS* 序列的证据[J]. 生物多样性, 2005, **13** (2): 174-179 [Li CX, Lu SG. Relationship of *Microsorium membranaceum* var. *carinatum* and *Microsorium membranaceum* var. *membranaceum* based on the sequence analysis of chloroplast *rbcL*, *rps4*, *trnL-trnF* and *rps4-trnS* [J]. *Biodiv Sci*, 2005, **13** (2): 174-179]

22 李俊清. 植物遗传多样性保护及其分子生物学研究方法[J]. 生态学杂志, 1994, **13** (6): 27-33 [Li JQ. Conservation of plant genetic diversity and related molecular biological techniques [J]. *Chin J Ecol*, 1994, **13** (6): 27-33]

23 葛颂, 洪德元. 濒危物种裂叶沙参及其近缘广布种泡沙参的遗传多样性研究[J]. 遗传学报, 1999, **26** (4): 410-417 [Ge S, Hong DY. Studies of morphological and allozyme variation of the endangered *Adenophora lobophylla* and its widespread congener *Apotaninii* [J]. *Acta Gen Sin*, 1999, **26** (4): 410-417]