

中国东部沿海水仙归化群体的遗传多样性

朱弘¹, 蔡厚才², 李涌福¹, 陈万东², 陈林¹, 伊贤贵¹, 李蒙¹, 段一凡^{1*},
王贤荣^{1*}

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 生物与环境学院, 亚热带森林生物多样性保护国家林业局重点实验室, 南京 210037; 2. 南麂列岛国家级海洋自然保护区管理局, 浙江 温州 325400)

摘要: 为揭示我国东部归化水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)的群体遗传多样性, 利用 2 个叶绿体基因 *matK* 和 *trnH-psbA* 片段对采自沪、浙、闽的 5 个代表群体的 49 株水仙进行了评估。结果表明, 双基因联合序列的总长为 1 443 bp, 共定义 6 个单倍型, 各归化群体的遗传多样性水平为 DLSY>PTD>NJD=ZZ>CMD。AMOVA 分析表明, 群体内变异为遗传变异的主要来源(91.98%), 群体间的遗传分化较低($F_{st}=0.080\ 22$)。群体物种水平上的谱系结构不显著($N_{st}=0.020<G_{st}=0.031$; $P<0.05$)。Mantel 检验表明水仙群体间的遗传距离与地理距离呈显著的线性相关($r=0.929$, $P=0.02<0.05$)。中性检验和错配分布分析结果均暗示水仙群体背离了快速扩张模型的假设。单倍型分布的中介网络图结合系统发育 NJ 树均将所有群体划分为 2 大分支。因此, 我国东部沿海水仙归化群体整体遗传多样性水平较低, 各群体间遗传分化较弱, 遗传变异主要来自群体内, 物种近期未经历扩张事件, 可能是基因流受海岛隔离、自身生物学特征、生境异质性与及人为干扰的综合作用影响。

关键词: 水仙; 中国东部沿海; 归化群体; 叶绿体 DNA; 遗传结构

doi: 10.11926/jtsb.4045

Genetic Diversity of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Populations in Eastern Coast of China

ZHU Hong¹, CAI Hou-cai², LI Yong-fu¹, CHEN Wan-dong², CHEN Lin¹, YI Xian-gui¹, LI Meng¹,
DUAN Yi-fan^{1*}, WANG Xian-rong^{1*}

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Biology and the Environment, Key Laboratory of State Forestry Administration on Subtropical Forest Biodiversity Conservation, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Nanji Islands National Marine Natural Reserve Administration Bureau, Wenzhou 325401, Zhejiang, China)

Abstract: To reveal the genetic diversity of naturalized *Narcissus tazetta* var. *chinensis* populations in eastern coast of China, 49 individuals from five representative populations distributed in Shanghai, Zhejiang and Fujian Provinces were evaluated by using two chloroplast DNA *matK* and *trnH-psbA* fragments. The results showed that total of six haplotypes were identified from the combined two sequences with an alignment length of 1 443 bp. The genetic diversity of naturalized population was in order of DLSY>PTD>NJD=ZZ>CMD. AMOVA analysis showed that the variation within populations was the main source of the genetic variation (91.98%) and low genetic differentiation between populations ($F_{st}=0.080\ 22$). Insignificant phylogeographic structure was detected at species level ($N_{st}=0.020<G_{st}=0.031$; $P<0.05$). Mantel test showed a significant linear correlation between genetic distance and geographical distance ($r=0.929$, $P=0.02<0.05$). The neutrality test combined bimodal curve in mismatch distribution analysis both rejected the hypothesis of the demographic expansion of these populations.

收稿日期: 2019-01-21 接受日期: 2019-03-15

基金项目: 南麂列岛国家级海洋自然保护区研究项目(NJKJ-2016-006)资助

This work was supported by the research program of Nanji Islands national marine natural reserve (Grant No. NJKJ-2016-006).

作者简介: 朱弘(1990~), 男, 博士研究生, 主要从事亚热带森林生态与谱系地理学研究。E-mail: 1107401987@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wangxianrong66@nifu.edu.cn; 67181278@qq.com

Analysis of median network and phylogenetic NJ tree based on the distribution of haplotype both divided all the populations into two major branches. These indicated a low level of genetic diversity with a weak genetic differentiation among *Narcissus tazetta* var. *chinensis* populations in eastern coast of China. Genetic variation mainly occurs in populations, while species had experienced no demographic expansion. These might likely owing to the gene flows which were caused by the combination of islands segregation, biological characteristics, habitat heterogeneity as well as human disturbance.

Key words: *Narcissus tazetta* var. *chinensis*; Eastern coast of China; Naturalized population; cpDNA; Genetic structure

水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)为石蒜科(Amaryllidaceae)多年生鳞茎植物,是欧洲水仙(*N. tazetta*)的变种,也是世界著名观赏花卉和中国传统十大名花之一,以其独特的形态和香气为世人所熟知。史籍考证与植物学证据表明该变种系地中海沿岸起源,主要归化分布于亚洲东部沿海地区或近海岛屿^[1],在我国栽培历史悠久,具有重要的观赏、经济与文化价值。随着对水仙种质资源数量与质量需求的日益提高,前人已在抗性生理^[2-3]、矮化机理^[4]、组培扩繁^[5]、功能基因^[6]等方面取得了一系列的研究。

掌握植物遗传多样性格局,是开展资源保护与利用的前提基础。探究植物群体遗传结构在时间和空间上的遗传变异特征及分布格局,在反映物种进化历史、生境适应等方面具有重要作用^[7-9]。群体研究主要包括传统的形态学和现代分子标记 2 种手段,分子标记具有不受环境或植株发育阶段影响、规避测量误差、可重复性高等优势。近 10 年来,随着分子生物学发展,国内外有关水仙属遗传多样性的研究,已由早期的 AFLP、ISSR、RAPD 等标记类型^[10-11]逐渐过渡到 DNA 测序。其中,基于叶绿体 DNA (cpDNA)标记和序列分析具有不受选择影响、多态性丰富等优点;同时,大多数被子植物 cpDNA 为母系遗传,比双亲遗传的 nrDNA 在亚种群间表现出更大的遗传分化,能产生更清晰的种群历史踪迹^[12],因此,当前 cpDNA 标记已成为研究植物群体遗传与谱系地理的主流手段之一,广泛应用于植物种间较低分类阶元和种内谱系地理学研究。

在野外调查中,笔者发现当前我国水仙归化地普遍存在生境片断化严重、种群规模和数量锐减等问题,有关其在区域尺度上的遗传多样性现状尚未报道。鉴于此,本研究采用 2 个水仙高变区的 cpDNA 标记,首次对我国水仙集中分布的东

部沿海地区的 5 个主要归化群体的序列变异进行分析,旨在了解以水仙归化群体为代表的海岛植物地理隔绝状态下的群体遗传多样性水平,以及分布格局的可能形成机制,以期为海岛特色种质资源的科学评价、合理保护与经营利用提供分子遗传学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2017 年冬季,个体样本自北向南分别采自上海、浙江、福建的 5 个归化水仙代表群体,覆盖了水仙在中国东部沿海的主要分布区,共计 49 个样本,记录样品编号、采集地点、经纬度、花型等基本信息(表 1),其中平潭岛(PTD)重瓣水仙为逸生的栽培品种‘玉玲珑’。群体内个体的采集距离至少相隔 10 m 以上,选择当年生新发的幼嫩叶片经变色硅胶干燥处理后,置于-20℃冰箱备用。活体材料引种至南京中山植物园,凭证标本存于南京林业大学树木标本馆(NF)。

1.2 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

植物基因组 DNA 采用柱式抽提纯化试剂盒(Tiagen, 北京)提取,用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Tanon-2500 全自动数码凝胶图像分析仪(Tanon, 上海)检测 DNA 质量。参考已报道的水仙属候选 DNA 条码^[13]进行筛选,预试验结果表明,水仙 cpDNA 编码区的 *matK* (F: 5'-CGATCTATTCATTCAATATTTTC-3', R: 5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3')与非编码区的 *trnH-psbA* (F: 5'-GTTATGCATGAACGTAA-TGCTC-3', R: 5'-CGCGCATGGTGGATTACAAT-CC-3')正反引物片段在种内群体水平表现出较高的变异,且测序成功率最高,故选择上述序列进行研究。PCR 扩增体系总体积为 25 μ L: 包含 2 \times *Taq*

表 1 5 个水仙归化群体的采集信息

Table 1 Information of collected species for five naturalized *Narcissus tazetta* var. *chinensis* populations

群体 Population	采样地和代码 Sample location and code	个体数 Number	经度 (E) Longitude	纬度 (N) Latitude	花型 Flower type	采集人 Collectors	采集日期 Collection date
POP 1	浙江大榭山屿 Daleishan Island, Zhejiang (DLSY)	10	121.09°	27.49°	单瓣 Single	段一凡, 朱弘 Duan Yi-fan, Zhu Hong	2017.01
POP 2	浙江南麂岛(三盘尾) Nanji Island, Zhejiang (NJD)	10	121.10°	27.46°	单瓣 Single	段一凡, 朱弘 Duan Yi-fan, Zhu Hong	2017.01
POP 3	上海崇明岛 Chongming Island, Shanghai (CMD)	10	121.77°	31.59°	单瓣 Single	王贤荣, 段一凡 Wang Xian-rong, Duan Yi-fan	2017.02
POP 4	福建平潭岛 Pingtan Island, Fujian (PTD)	9	119.77°	25.44°	重瓣 Double	王贤荣, 王华辰 Wang Xian-rong, Wang Hua-chen	2017.02
POP 5	福建漳州 Zhangzhou, Fujian (ZZ)	10	117.52°	24.54°	单瓣 Single	王贤荣, 王华辰 Wang Xian-rong, Wang Hua-chen	2017.02

PCR MasterMix (TsingKe, 南京) 12.5 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L (GenScript, 南京), DNA 模板 2.0 μ L, 最后用 ddH₂O 8.5 μ L 补齐。matK 的 PCR 扩增程序为 94°C 预变性 3 min, 然后 94°C 变性 30 s, 41°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次, 最后 72°C 延伸 10 min; trnH-psbA 的 PCR 扩增程序为 94°C 预变性 3 min, 然后 94°C 变性 30 s, 47°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次, 最后 72°C 延伸 10 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行纯化与测序, 样本基于 ABI 3730XL 测序平台进行正向测序。

1.3 数据分析

将获得的单基因序列分别在 BioEditor 7.0.9 软件^[14]中的 ClustalW 模块进行联配与手工校正。使用 SequenceMatrix 1.7.8 软件包^[15]进行双基因序列的拼接。利用 DNASP 5.10.1 软件^[16]进行联合序列的特征分析, 包括统计单倍型(haplotype)数量(h)、平均核苷酸差异数(average number of nucleotide, K)、单倍型多样性(haplotype diversity, H_d)、核苷酸多样性(nucleotide diversity, π)、遗传分化系数(G_{st})、基因流(N_m)等遗传多样性指数以及种群历史动态的中性检验(neutrality test)和失配分析(mismatch distribution), 群体间基因流采用 $N_m = (1/G_{st} - 1)/2$ ^[20]进行估算。使用 Arlequin 3.1 软件^[17]进行分子方差分析以判别变异的来源。使用 PermutCpSSR 2.0 软件包(<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/Permut/>)中的 U 统计法检验(1 000 次重复置换)比较遗传分化系数 G_{st} 和 N_{st} , 以检验水仙是否存在谱系地理结构。使用 GenAlEx 6.503 软件包^[18]在 Microsoft Excel 2007 中进行 Mantal 检验, 分析水仙群体遗传距离与地理距离是否存在地理隔离(isolation by distance, IBD)作用。在 Network 5.0.1.0 软件([\[engineering.com/sharenet.htm/\]\(http://engineering.com/sharenet.htm/\)\)中基于最大简约性原则的中介邻接网络法\(median-joining network, MJ\)获得单倍型中介网络图, 并在 Adibe Illustrator CS6 软件中进行优化布局与重新绘制。并利用 MEGA 5.0 软件^{\[19\]}构建以邻接法\(neighbor-joining, NJ\)为算法的单倍型系统发育树, 并采用 bootstrap 法\(1 000 次重复置换\)以检验聚类树各分支置信度。](http://www.fluxus-</p>
</div>
<div data-bbox=)

2 结果和分析

2.1 序列变异与单倍型分布

两个 cpDNA 片段拼接后的序列总长度为 1 443 bp, G+C 含量为 33.10%, 共检测出 8 个变异位点(7 个简约信息位点和 1 个自裔位点); 共定义了 6 个单倍型(haplotypes, Hap1~Hap6), 其中 matK 对应的变异位点为 673、767、801、807 和 809, trnH-psbA 对应的变异位点为 906、1 333 和 1 383。根据溯祖理论, 贡献单倍型(Hap2)位于单倍型中介网络中心, 应为 5 个地理群体的共有古老单倍型, 而私有单倍型则分散在各个群体, 应为近期辐射分化出来的年轻单倍型(图 1, 表 2)。

2.2 遗传多样性评估

从表 3 可见, 群体的总体单倍型多样性(H_d)为 0.363 ± 0.086 , 核苷酸多样性(π)为 $0.000 49 \pm 0.000 19$; 按遗传多样性水平, 5 个水仙归化群体依次为大榭山屿(DLSY) > 平潭岛(PTD) > 南麂岛(NJD) = 漳州(ZZ) > 崇明岛(CMD)。

2.3 群体遗传结构与分化

从表 4 可见, 两两群体间的基因流较强, 且所有群体间的基因流都 > 4; 分子方差分析(AMOVA)结果表明, 群体内变异占了总变异的 91.98%, 为遗

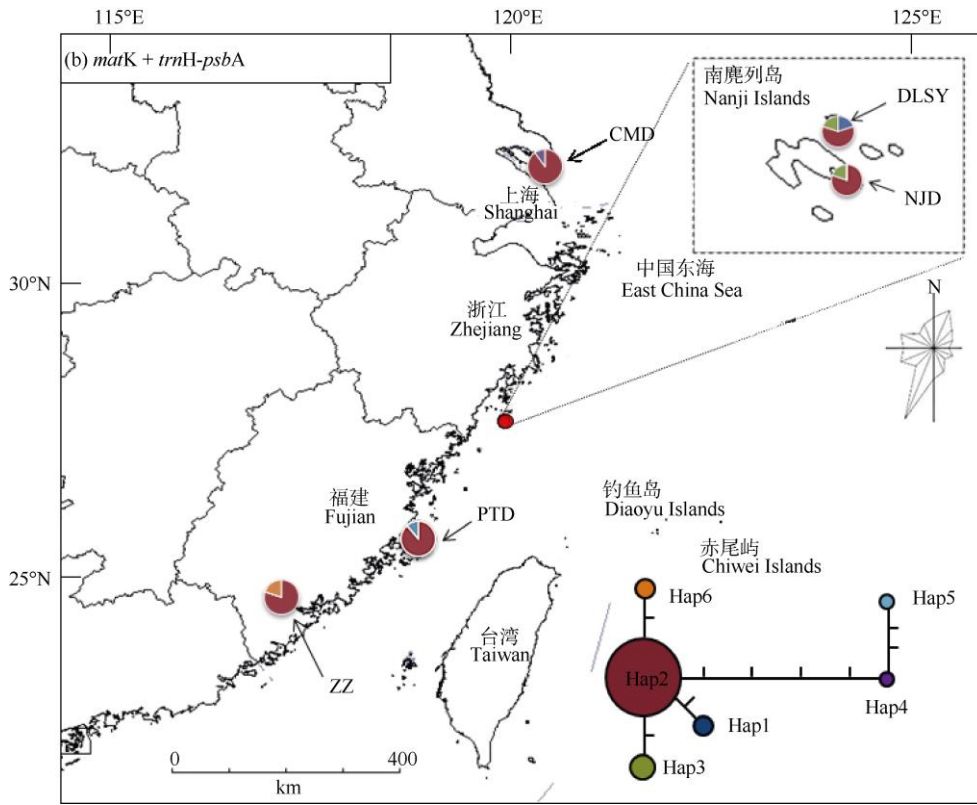


图 1 中国东部沿海 5 个水仙归化居群的叶绿体单倍型分布

Fig. 1 Distribution of cpDNA haplotypes of five naturalized *Narcissus tazetta* var. *chinensis* populations in eastern coast of China

表 2 基于叶绿体 *matK*+*trnH-psbA* 序列的水仙 6 个单倍型中的变异位点

Table 2 Variable sites among the six haplotypes of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* based on sequences of chloroplast *matK*+*trnH-psbA*

单倍型 Haplotype	<i>matK</i>					<i>trnH-psbA</i>			分布数量 Number
	673	767	801	807	809	905	1333	1382	
Hap1	A	T	G	T	G	C	T	G	2
Hap2	G	*	*	*	*	*	*	*	39
Hap3	G	*	*	*	*	G	*	*	4
Hap4	G	C	A	A	T	*	*	*	1
Hap5	G	C	A	A	T	*	A	T	1
Hap6	G	*	G	*	*	*	A	*	2

*: 该碱基变异位点与 Hap1 相同。

*: Variation site of the base is the same as Hap1.

表 3 5 个水仙归化群体的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of five naturalized *Narcissus tazetta* var. *chinensis* populations

群体 Population	单倍型数 (<i>h</i>) Number of haplotype	多态性位点数 Number of polymorphic sites (<i>S</i>)	平均核苷酸差异数 (<i>K</i>) Average number of nucleotide differences	单倍型多样性 Haplotype diversity (<i>H_d</i>)	核苷酸多样性 Nucleotidediversity (π)
DLSY	3	2	0.711	0.622 ± 0.138	0.000 49 ± 0.000 14
NJD	2	1	0.356	0.356 ± 0.159	0.000 25 ± 0.000 11
CMD	1	0	0.000	0.000 ± 0.000	0.000 00 ± 0.000 00
PTD	2	6	1.333	0.378 ± 0.181	0.000 92 ± 0.000 69
ZZ	2	1	0.356	0.356 ± 0.159	0.000 25 ± 0.000 11
总和 Total	6	8	0.711	0.363 ± 0.086	0.000 49 ± 0.000 19

表 4 5 个水仙归化群体间的遗传分化系数(G_{st} , 对角线下)及基因流(N_m , 对角线上)

Table 4 Genetic differentiation coefficient (G_{st} , under diagonal) and Gene flow (N_m , above diagonal) among five naturalized *Narcissus tazetta* var. *chinensis* populations

群体代码 Population code	DLSY	NJD	CMD	PTD	ZZ
DLSY	-	12.000	4.222	4.385	4.000
NJD	0.040	-	4.222	4.454	4.000
CMD	0.106	0.106	-	4.808	4.222
PTD	0.102	0.101	0.094	-	5.445
ZZ	0.111	0.111	0.106	0.084	-

传变异的主要来源; 固定指数(F_{st})为 0.080 22, 群体间的遗传分化较弱(表 5); 通过 1 000 次重复计算获得的群体遗传分化系数($N_{st}=0.020 < G_{st}=0.031; P < 0.05$), 表明水仙在物种水平上不具有明显的谱系结构。

表 5 5 个水仙归化群体的分子方差(AMOVA)分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) for five naturalized *Narcissus tazetta* var. *chinensis* populations

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	总方差 Sum of squares	变异成分 Variance component	%	固定系数 Fixation index (F_{st})
群体间 Among populations	4	2.461	0.028 94	8.02	0.080 22
群体内 Within populations	44	14.600	0.331 82	91.98	-
总和 Total	48	17.061	-	-	-

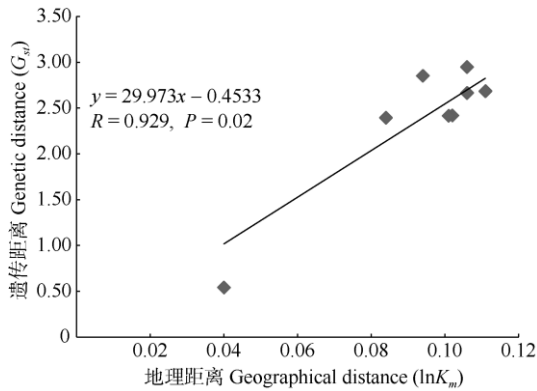


图 2 水仙归化群体遗传距离与地理距离的 Mantel 检测
Fig. 2 Mantel test between genetic distance and geographical distance of naturalized *Narcissus tazetta* var. *chinensis* populations

2.5 单倍型系统发育关系

基于遗传距离邻接法构建的单倍型系统发育树(图 4)可知, 与中介网络图结果一致(图 1), 水仙 6 个单倍型明显被划分为 2 个谱系分支, Hap4 与 Hap5 聚为一大支, 其余单倍型聚为另一大支, 靴带支持率(bootstrap)分别为 80%和 88%。其中 Hap1、

水仙归化群体间的遗传距离(G_{st})与地理距离(K_m , 自然对数转化)矩阵的 Mantel 检验结果表明, 两者之间具有显著的线性关系($r=0.929, P=0.02 < 0.05$) (图 2)。

2.4 群体扩张事件检测

选择中性检验和失配分析推测水仙群体的扩张事件。通常用 Tajima 的 D 指数^[21]可以反映较大时间尺度上的种群事件, 而 Fu 的 D^* 指数^[22]对近期的事件比较敏感。本研究结果表明, 中性检验均无显著性意义($D=-0.165 395, P > 0.05; D^*=0.590 83, P > 0.10$)。同时, 错配分布分析(MDA)中, 观测值与期望值比较得到的双峰曲线结果也表明水仙群体背离了快速扩张模型的假设, 即群体在进化过程中未经历过快速扩张(图 3)。

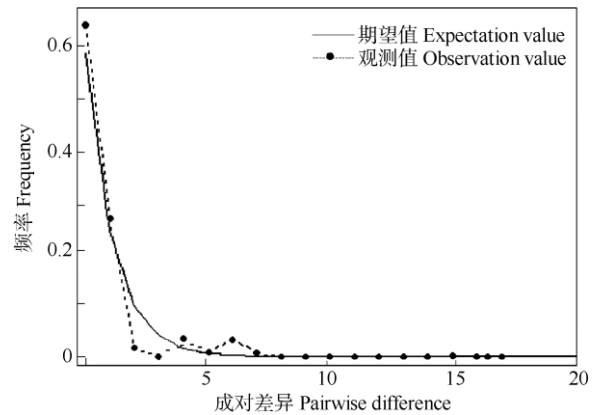


图 3 水仙 49 个个体错配分布分析
Fig. 3 Mismatch distribution analysis for 49 individuals of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*

Hap3 与 Hap2 又单独聚为一小支, 从而表现出更近的亲缘关系。

3 讨论

开展遗传变异分析有助于评价物种的进化潜

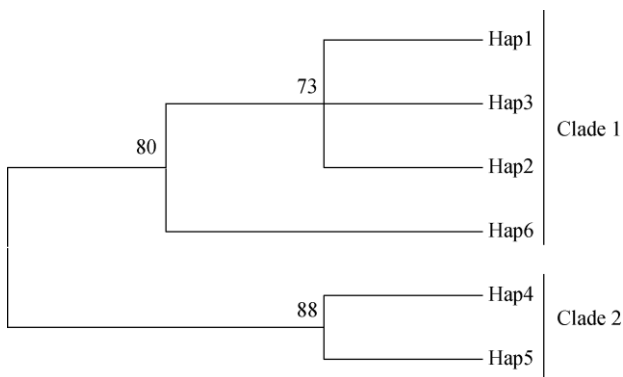


图 4 水仙 6 个单倍型的系统发育树。分支上数值为 1 000 次重复得到的靴带支持率。

Fig. 4 Phylogenetic tree of six haplotypes of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Data above branches indicate the bootstrap values based on 1 000 replicates.

力与环境适应能力,也是开展保护生物学的核心^[23-25]。基于 cpDNA 序列变异的结果,从整体上看,我国归化水仙的遗传多样性水平较低,这与前人应用 RAPD 等其他标记手段的研究结果一致^[10]; Mantel 检测的相关系数较高且达到显著水平($r=0.929, P<0.05$),符合地理隔离 IBD 模型,归化群体遗传距离更受地理距离影响显著,表明海岛间的地理隔离已经成为该种基因流扩散的主要屏障。细胞染色体研究表明,中国水仙主要为同源三倍体^[26],在自然状况下水仙只能采取以母鳞茎为中心的侧球无性繁殖方式,大多呈聚集分布,缺乏长距离的传播机制^[27],使得居群内交流远大于居群间。本研究中的分子方差分析结果亦显示水仙群体变异主要来源于种群内(91.98%)。此外,水仙栖息地严酷生境尤其是土壤的贫瘠及基盐胁迫无疑降低了水仙种群的生态适应性,而其物候花期寒冷的气温与强烈的海风等因素或可导致长距离的传粉者缺失,奠基者效应的出现大大降低了群体遗传多样性。

植物在长期的迁移演化过程中为适应不同生境形成了不同的地理生态类群,生态隔离(isolation by ecology, IBE)作用往往可以加速物种的遗传分化^[28]。前人的研究均表明归化水仙在我国存在一定的遗传变异特征^[29],陈晓慧等^[30]基于居群统计,分析比较了我国沿海 4 个岛屿 8 个群体的形态学特征差异,认为南麂产的水仙具有植株小、花朵大的特点,是一种珍稀遗传资源。而结合本文的 cpDNA 单倍型分布来看(图 1),各群体均含有 1 个以上的私有单倍型,暗示我国沿海岛屿的环境异质性较高,水仙居群可能存在局域适应(local adaptation)现象;水仙属

植物通常性喜温暖、湿润及沙质土壤,在我国东部归化群体中,大柘山屿(DLSY)含有 2 个私有单倍型导致其遗传多样性综合排序第一,这可能是由于其地处南麂列岛国家级自然保护区核心区的地理优势,在区系划分上属于华东植物区系南北过渡特征,亚热带海洋性季风区及台湾暖流带来的水热气候条件相对充沛^[31];基于群落生态学研究亦表明,大柘山屿具有适宜水仙生长的排水较好、土壤盐分适中与温度适宜的微生境^[27],可能使得大柘山屿群体产生了适应性分化。有意思的是,该群体与紧邻的南麂岛(NJD)共享一个单倍型(Hap3),且基因流($N_m=12.000$)最高、遗传分化($G_{st}=0.040$)最小,相较其它群体而言显示出最近的亲缘关系;而虽然在物种水平上遗传多样性较低,但水仙各群体间的平均基因流均 >4 ,说明群体间的基因流持续发生(表 5),结合单倍型系统发育分析,聚类结果也与地理距离不一致(图 4)。根据实际调查走访得知,造成上述现象很可能与历史上海岛渔民人为多次移栽事件密切相关,即群体间可能经常性交换迁徙个体;cpDNA 单倍型中介网络图还显示,平潭岛(PTD)与其余群体的亲缘关系相对最远,该群体是归化水仙中为数不多的重瓣类型‘玉玲珑’,其副花冠和雄蕊花瓣状,黄白相间,与大部分单瓣、纯白花色类型截然不同^[32],有关其花色及花形变异的生理与分子机制还有待进一步研究,但无疑反映了人类经济活动对水仙遗传分布格局带来的持续影响。

目前在我国水仙市场上,栽培品种中除了‘玉玲珑’,还有‘金三角’、‘金边’和‘云香’等,但都分布不均,栽培面积极少且产地不明,品种类群十分单一;而且由于水仙很难通过有性繁殖同其他物种进行杂交获得新的基因,长期的无性繁殖,势必导致种群衰退、品质降低等问题,这将严重制约水仙花卉产业的可持续发展^[33]。因此,开展我国归化水仙资源种群动态和遗传变异的研究进而获得基础的遗传学背景信息是非常必要的。本研究综合利用了植物分子谱系地理学的方法,首次对我国东部沿海水仙 5 个代表归化群体 49 个样本进行遗传多样性检测及分析,初步阐明了该物种在区域尺度上的遗传多样性水平与空间分布,这无疑有助于下一步水仙衰退种群的恢复保育工作的开展。同样以南麂岛产水仙尤其是大柘山屿为代表,基于群体遗传 cpDNA 标记的分子证据,该归化群体应为中国东部沿海一个特殊且重要的基因型或生态型分化类群,目前虽

然已经列入核心保护区,但由于靠近旅游区仍然面临人类经济活动的日益影响,应结合沿海岛屿特殊的生态系统进行综合管理,做好持续的宣传、保护与管理工作。短期而言,就地保护可能是最为有效的措施,可以在保护区内增加护栏、控制伴生入侵杂草及定期巡护工作;长期而言,一方面通过原地建立固定样地,开展对种群及物候的动态监测,另一方面通过离体培养、人工种苗扩繁、自然回归试验等措施,从而促进其种群的正向更新。同时也应发挥其重要的科学价值,将该区域优先选为核心种质苗圃或遗传基因库建设的遗传材料来源地,或可从中选择适宜的亲本以提高杂交育种效率。总之,本研究可为海岛特色种质资源的综合评价、科学保护与开发利用提供理论依据。

参考文献

- [1] CHEN X Q, WU Y X. Additional notes on Chinese sacred lily, with a discussion with Mr. Lu [J]. *J Wuhan Bot Res*, 1991, 9(1): 70–74.
陈心启, 吴应祥. 中国水仙续考——与卢履范同志商榷 [J]. *武汉植物学研究*, 1991, 9(1): 70–74.
- [2] LI X F, SHAO X H, DENG X J, et al. Necessity of high temperature for the dormancy release of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *J Plant Physiol*, 2012, 169(14): 1340–1347. doi: 10.1016/j.jplph.2012.05.017.
- [3] BIAN A A, PAN D M. Effects of salt stress on growth and inorganic ion distribution in *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem. seedlings [J]. *Hort Sci*, 2018, 53(8): 1152–1156. doi: 10.21273/hortsci13145-18.
- [4] LI Y, CAI P, JIANG L L, et al. Propagation of wild daffodils in Suzhou City, Jiangsu Province [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2010(6): 276–278.
李颖, 蔡平, 姜丽丽, 等. 苏州野生水仙繁殖技术研究 [J]. *江苏农业科学*, 2010(6): 276–278.
- [5] ZHANG X Q, GAO J, PENG Z H. Callus induction, differentiation and histological observation of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* floral organs [J]. *For Res*, 2013, 26(3): 320–325.
张晓晴, 高健, 彭镇华. 中国水仙花器官愈伤组织诱导、分化及组织学观察 [J]. *林业科学研究*, 2013, 26(3): 320–325.
- [6] WU J C, WANG G Q, ANWAR M, et al. Cloning and functional analysis of R2R3-MYB gene *NtMYB5* in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *Acta Hort Sin*, 2018, 45(7): 1327–1337. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2017-0889.
吴嘉诚, 王桂青, ANWAR M, 等. 中国水仙 R2R3-MYB 基因 *NtMYB5* 的克隆和功能研究 [J]. *园艺学报*, 2018, 45(7): 1327–1337. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2017-0889.
- [7] QU R Z, HOU L, LÜ H L, et al. The gene flow of population genetic structure [J]. *Hereditas*, 2004, 26(3): 377–382.
曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流 [J]. *遗传*, 2004, 26(3): 377–382.
- [8] WANG Z F, LIAN J Y, HUANG G M, et al. Genetic groups in the common plant species *Castanopsis chinensis* and their associations with topographic habitats [J]. *Oikos*, 2012, 121(12): 2044–2051. doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20483.x.
- [9] LIU P P, LIAO H B, JIANG Q C, et al. Spatial genetic structure of *Aquilaria sinensis* in Wuguishan, Zhongshan, Guangdong Province [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2019, 27(1): 65–73. doi: 10.11926/jtsb.3917.
刘盼盼, 廖浩斌, 蒋谦才, 等. 广东省中山市五桂山土沉香空间遗传结构 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2019, 27(1): 65–73. doi: 10.11926/jtsb.3917.
- [10] LIU X M, ZHANG X Z, SHI Y M, et al. Genetic diversity analysis of nine *Narcissus* based on morphological characteristics and random amplified polymorphic DNA markers [J]. *Hort Sci*, 2017, 52(2): 212–220. doi: 10.21273/HORTSCI11171-16.
- [11] CHEN L J, TIAN H Q, WU J. The study on RAPD fingerprints of *Narcissus* in China and Europe [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2003, 11(2): 177–180. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2003.2.019.
陈林蛟, 田惠桥, 武剑. 中国水仙与欧洲水仙品种 RAPD 指纹的研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2003, 11(2): 177–180. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2003.2.019.
- [12] XU G B. Intraspecific phylogeography and its application in conservation strategies of plant genetic diversity [J]. *J CS Univ For Technol*, 2011, 31(12): 1–6.
徐刚标. 种内谱系地理学及在植物遗传多样性保护中的应用 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2011, 31(12): 1–6.
- [13] ZHANG C F, YU W T, LI M, et al. Identification of DNA barcodes in *Narcissus* [J]. *J Fujian Agric For Univ (Nat Sci)*, 2018, 47(4): 452–460.
张程飞, 于文涛, 李敏, 等. 水仙属 DNA 条形码鉴定技术 [J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2018, 47(4): 452–460.
- [14] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95–98.
- [15] VAIDYA G, LOHMAN D J, MEIER R. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information [J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 171–180. doi: 10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x.
- [16] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- [17] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (Version 3.0):

- An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evol Bioinform*, 2005, 1: 47–50. doi: 10.1177/117693430500100003.
- [18] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx 6. 5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: An update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- [19] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121.
- [20] BAO Y X, CHENG H Y, ZHOU X W, et al. Genetic diversity of three populations of the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) [J]. *Acta Ecol Sin*, 2008, 28(8): 4030–4036.
鲍毅新, 程宏武, 周襄武, 等. 黑鹿(*Muntiacus crinifrons*) 3 个种群的遗传多样性 [J]. *生态学报*, 2008, 28(8): 4030–4036.
- [21] TAJIMA F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585–595.
- [22] FU Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915–925.
- [23] MENEZES T, ROMEIRAS M M, DE SEQUEIRA M M, et al. Phylogenetic relationships and phylogeography of relevant lineages within the complex Campanulaceae family in Macaronesia [J]. *Ecol Evol*, 2018, 8(1): 88–108. doi: 10.1002/ece3.3640.
- [24] JIAN H Y, LI S F, GUO J L, et al. High genetic diversity and differentiation of an extremely narrowly distributed and critically endangered decaploid rose (*Rosa praelucens*): Implications for its conservation [J]. *Conserv Genet*, 2018, 19(4): 761–776. doi: 10.1007/s10592-018-1052-0.
- [25] ZHANG L W, HAN G X. A review on the relationships between plant genetic diversity and ecosystem functioning [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2018, 42(10): 977–989. doi: 10.17521/cjpe.2018.0013.
张俪文, 韩广轩. 植物遗传多样性与生态系统功能关系研究进展 [J]. *植物生态学报*, 2018, 42(10): 977–989. doi: 10.17521/cjpe.2018.0013.
- [26] HONG L, LIANG G L. Research advance in genetic and biological characteristics of *Narcissus* [J]. *Subtrop Plant Sci*, 2011, 40(2): 89–96.
洪林, 梁国鲁. 水仙属植物遗传学及生物学特性研究进展 [J]. *亚热带植物科学*, 2011, 40(2): 89–96.
- [27] ZHU H, CAI H C, YOU L X, et al. Analyses on species diversity, environmental interpretation and spatial distribution pattern of natural population of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* on Daleishan Island of Nanji Islands in Zhejiang Province [J]. *J Plant Resour Environ*, 2017, 26(3): 100–108. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.03.13.
朱弘, 蔡厚才, 尤禄祥, 等. 浙江南麂列岛大楮山屿水仙自然居群的物种多样性、环境解释及空间分布格局分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2017, 26(3): 100–108. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.03.13.
- [28] LI M, WANG S X, GAO B J. Analysis of genetic diversity of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*) natural secondary forest populations and correlation with their habitat ecological factors [J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, 33(12): 3602–3610.
李明, 王树香, 高宝嘉. 油松天然次生林居群遗传多样性及与产地地理气候因子的关联分析 [J]. *生态学报*, 2013, 33(12): 3602–3610.
- [29] CHEN D F, GAO J, PENG Z H. Advances and perspectives in studies on *Narcissus* plants [J]. *Sci Silv Sin*, 2008, 44(3): 140–146.
陈段芬, 高健, 彭镇华. 水仙属植物研究进展 [J]. *林业科学*, 2008, 44(3): 140–146.
- [30] CHEN X H, ZHENG K, CHEN Z H, et al. Morphological variation in wild populations of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and taxonomy position of *Narcissus* in Nanji Islands [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2012, 40(33): 16041–16044.
陈晓慧, 郑康, 陈珍慧, 等. 中国水仙野生居群形态变异及其南麂水仙分类地位的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(33): 16041–16044.
- [31] ZHU H, KU W P, RONG J T, et al. Species diversity and floristic characteristics of vascular plants in Nanji Island, Zhejiang Province [J]. *Plant Div Resour*, 2015, 37(6): 713–720. doi: 10.7677/ynzwjy201515050.
朱弘, 库伟鹏, 戎建涛, 等. 浙江南麂岛陆生维管束植物多样性及区系特征 [J]. *植物分类与资源学报*, 2015, 37(6): 713–720. doi: 10.7677/ynzwjy201515050.
- [32] LIN X H. Morphological and anatomical study on three *Narcissus tazetta* var. *chinensis* variant strains (strains) [J]. *J CS Univ For Technol*, 2012, 32(10): 135–140.
林晓红. 三个中国水仙变异品系(株系)的形态解剖研究 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2012, 32(10): 135–140.
- [33] SHI S J, YE R M. Plant classification of *Narcissus* and current status of utilization and study on Chinese *Narcissus* germplasm resource [J]. *Fujian Agric Sci Technol*, 2016, 47(4): 52–58.
施世强, 叶如梦. 水仙属植物分类及中国水仙资源利用研究现状 [J]. *福建农业科技*, 2016, 47(4): 52–58.