

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201709027

引文格式: 蒋谦才, 谭宗健, 廖浩斌, 等. 广东省中山市五桂山土沉香遗传多样性 [J]. 广西植物, 2018, 38(6): 804-811  
JIANG QC, TAN ZJ, LIAO HB, et al. Genetic diversity of *Aquilaria sinensis* in Wuguishan, Zhongshan, Guangdong Province [J]. *Guihaia*, 2018, 38(6): 804-811

## 广东省中山市五桂山土沉香遗传多样性

蒋谦才<sup>1</sup>, 谭宗健<sup>1</sup>, 廖浩斌<sup>1</sup>, 刘盼盼<sup>1</sup>, 孙红梅<sup>1</sup>, 王瑞江<sup>2</sup>,  
曹洪麟<sup>2</sup>, 黄向旭<sup>2</sup>, 赖思茹<sup>2</sup>, 梁丹<sup>2</sup>, 王峥峰<sup>2\*</sup>

(1. 中山市国有森林资源保护中心, 广东 中山 528400; 2. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

**摘要:** 土沉香(*Aquilaria sinensis*)是生产中药沉香的重要树种,现被列为国家二级重点保护野生植物。该研究通过采集该地区 83 株土沉香样品,利用限制性酶切位点相关 DNA 测序(restriction site-associated DNA sequencing, RAD-seq)方法获得的 18 个微卫星体作为分子标记,计算了五桂山土沉香种群的整体观测杂合度(observed-heterozygosity)、期望杂合度(expected-heterozygosity)、种群整体近交系数及其个体间的亲缘关系,并对种群可能经历的种群缩小或种群扩张状况进行了分析。结果表明:与同属其它物种以及同一生活史物种相比,五桂山地区土沉香遗传多样性略低(观测杂合度和期望杂合度分别为 0.523 和 0.522),但种群整体处于随机交配状态(近交系数为-0.002)。瓶颈效应分析表明该种群没有经历瓶颈效应,且 81.810%的个体间无亲缘关系,说明这一地区土沉香并非少数个体发育起来;种群扩张分析表明其种群大小有增长情形。综合这些结果可以看出,中山市五桂山土沉香种群整体遗传健康状况良好,较好地保存了该区域种质资源遗传多样性,为今后的保护和合理开发提供了优质资源储备。

**关键词:** 瓶颈效应, 亲缘关系, 微卫星体, 遗传变异, 种群扩张

中图分类号: Q319+.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)06-0804-08

## Genetic diversity of *Aquilaria sinensis* in Wuguishan, Zhongshan, Guangdong Province

JIANG Qiancai<sup>1</sup>, TAN Zongjian<sup>1</sup>, LIAO Haobin<sup>1</sup>, LIU Panpan<sup>1</sup>, SUN Hongmei<sup>1</sup>,  
WANG Ruijiang<sup>2</sup>, CAO Honglin<sup>2</sup>, HUANG Xiangxu<sup>2</sup>, Lai Siru<sup>2</sup>,  
Liang Dan<sup>2</sup>, WANG Zhengfeng<sup>2\*</sup>

(1. Zhongshan State-owned Forest Resources Protected Center, Zhongshan 528407, Guangdong, China;

2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

收稿日期: 2017-11-28

**基金项目:** 广东省科技计划项目(2017A030303060); 中山市财政局资金项目, 东莞市科技项目(2015108101002); 广东省林业厅中药材保护项目(2017); 广东省林业厅野生动植物保护和湿地保护专项项目(2130299); 广东省野生动植物保护管理项目(2016) [Supported by Science and Technology Program of Guangdong Province (2017A030303060); Zhongshan Finance Bureau, Science and Technology Program of Dongguan City (2015108101002); Conservation of Traditional Chinese Medicine by Forestry Administration of Guangdong(2017); Special Foundation for Conservation of Wild Animals, Plants and Wetlands by Forestry Administration of Guangdong (2130299); Program for Conservation and Management of Wild Animals and Plants in Guangdong Province(2016)]。

**作者简介:** 蒋谦才(1968-), 男, 广东河源人, 硕士, 教授级高级工程师, 从事林业及保护区管理工作, (E-mail)jqc139@126.com。

\* **通信作者:** 王峥峰, 博士, 研究员, 主要从事分子生态学研究, (E-mail)wzf@scib.ac.cn。

**Abstract:** *Aquilaria sinensis*, famous of its fragrant wood, is listed as national Level II protected wild plants. For sound conservation this precious population of *A. sinensis* in Wuguishan District of Zhongshan City, we conducted genetic diversity surveys on it. Because population history such as shrinking or expansion would definitely leave signatures in population genetic variations, based on the genetic diversity investigated in Wuguishan population of *A. sinensis*, we also made population history inferences for it. Among genetic diversity studies, microsatellite markers are the most suitable tools due to their high polymorphism. Therefore, using eighteen microsatellites obtained by restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq), we examined the genetic diversities of 83 *A. sinensis* individuals collected from Wuguishan District, and estimated genetic diversity parameters by observed-heterozygosity, expected-heterozygosity and inbreeding index. Because the genetic relationship between individuals could reflect whether Wuguishan population of *A. sinensis* was derived from a few ancestors, pairwise genetic relatedness was calculated and four types of relationship (parent-offspring, full-siblings, half-siblings and unrelated) between individuals were determined. The population history was inferred for population shrinking (bottleneck) or expansion. Overall, compared to the genetic variation of the species in the same genus and the species with similar life history traits, the genetic diversity in Wuguishan population was slightly low with the observed-heterozygosity and expected-heterozygosity being 0.523 and 0.522, respectively. The value of  $-0.002$  for inbreeding index, which was close to zero, indicated that the whole population was under random mating. Bottleneck analysis indicated bottleneck effects did not happened recently in Wuguishan population, which meant no population shrinking. Pairwise relationships between individuals confirmed this by showing most of individual pairs ( $>81.810\%$ ) were unrelated. Finally, we detected the evidence of population expansion on the basis of allele size distributions. Accordingly, these results indicated that Wuguishan population of *A. sinensis* is generally genetically healthy. Such information provides the reference for the conservation and the reasonable uses of *A. sinensis* in the future.

**Key words:** bottleneck effects, genetic relationship, microsatellites, genetic variation, population expansion

土沉香 (*Aquilaria sinensis*) 为瑞香科 (Thymelaeaceae) 沉香属 (*Aquilaria*) 多年生热带、亚热带常绿乔木, 是中国特有物种。它为国产中药沉香的正品来源, 也是我国生产中药沉香的唯一植物资源 (贾文杰等, 2010)。沉香不仅是我国传统中药材, 更列为十大广药之一。但土沉香的结香是一个复杂的生物物理化学过程, 其香气至今无法人工合成。沉香被喻为植物中的钻石, 十分珍贵。野生土沉香主要分布于我国广东、广西、海南、云南等省 (区), 但在福建、台湾、四川等省有栽培。由于人们为牟取暴利滥采乱伐, 土沉香遭到严重破坏, 再加上其天然更新能力弱, 导致土沉香野生资源日趋减少。目前, 土沉香被列为国家二级重点保护野生植物 (《国家重点保护野生植物名录》, 1999), 也被 IUCN 列为禁止贸易的种类。2016 年广东省颁布的《广东省岭南中药材保护条例》把包括土沉香在内的八种极具岭南特色的中药材作为首批地方特色资源进行保护和开发, 以实现规范利用沉香资源, 促进地区土沉香产业持

续健康发展。沉香在我国具有悠久的历史, 其之誉源于隋唐, 盛于宋代。而东莞地区是土沉香最主要种植地, 品质最优。古时东莞为东莞县, 地域广大, 包括了现在的香港、深圳、宝安、中山及东莞市 (梅全喜等, 2007)。中山市原名香山县, 是东莞地区沉香中心和最主要产地 (梅全喜等, 2007, 2011), 即以“地宜香木”得名, 是“中国沉香之乡”, 也是东莞地区沉香和“道地”性代表。虽然中山市土沉香也历经盗砍盗伐等破坏, 但在其境内五桂山及其周边风水林中还残存一些较大土沉香植株, 极具保护价值 (梅全喜, 2016)。五桂山是中山市的主要山脉, 其中蕴含丰富的物种资源, 其中以土沉香最为著名。截止至今, 当其他地区的原始土沉香资源由于各类原因减少消失, 五桂山还保留有众多较原始土沉香, 是这一区域土沉香资源宝库, 具有很重要的开发利用潜力。

遗传多样性是物种长期生存适应的基础 (季维智和宿兵, 1999; Shi, 1993; Lankau & Strauss, 2007; Kettenring et al, 2014)。1980 年的《世界自

然资源保护大纲》和 1992 年《生物多样性保护公约》中都把保护物种遗传多样性作为其中主要目标。2014 年我国又颁布了《加强生物遗传资源管理国家工作方案(2014—2020 年)》和《生物多样性保护重大工程实施方案(2014—2020 年)》。遗传多样性对于林业生产同样具有非常重要的作用。2013 年,联合国粮农组织制定了《森林遗传资源养护、可持续利用和开发全球行动计划》;2015 年我国国家林业局《中国林业遗传资源保护与可持续利用行动计划(2015—2025 年)》把林业遗传资源作为我国战略资源,从调查、收集、保护、评价和利用等多个方面阐述了我国林业遗传资源的至关重要性,表明当前对我国林木遗传多样性的调查、保护和开发的迫切需求。因此开展中山市五桂山地区土沉香遗传多样性研究对于合理保护和开发这一珍贵的物种资源具有重要意义。针对此,利用微卫星体分子标记,我们开展如下两方面的研究:(1)探讨五桂山土沉香整体遗传多样性(大小)状况。(2)考虑到历史上对土沉香的破坏,利用遗传多样性数据,了解土沉香种群形成历史状况。包括五桂山土沉香种群是否经历过瓶颈效应?个体间亲缘关系如何?是否由较少残留的个体发展起来的(导致个体间亲缘关系很近)?种群形成过程是否有自然扩张情形?即种群大小是否一直保持恒定,还是有明显的扩大。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究地点和样品采集

研究地位于广东省中山市五桂山生态保护区内,五桂山生态保护区位于广东省中南部,地处珠江出海口,地理坐标为  $113^{\circ}20'—113^{\circ}35' E$ ,  $22^{\circ}16'—22^{\circ}27' N$  之间,属亚热带季风气候,光热充足,雨量充沛,年均气温为  $22.0^{\circ}C$ ,极端最高气温  $36.7^{\circ}C$ ,极端最低气温  $-1.3^{\circ}C$ ,年均降水量为  $1738 mm$ (蒋谦才等,2005)。研究区域内土壤类型为赤红壤,植被代表类型为热带季雨林型的常绿季雨林。五桂山主峰海拔  $531 m$ ,是中山市最高峰;为中山市的“市肺”,总面积  $198.3 km^2$ ,是珠江口西岸唯一的大面积森林绿地(樊风雷等,2013)。

五桂山生态保护区内动植物资源丰富(蒋谦才等,2005,2006,2011;林俊新等,2006;黎清等,2011;张玉山等,2012),蕴含多种珍稀濒危植物,包括极具特色的土沉香。

在五桂山土沉香集中分布地区采集胸径级大于  $5 cm$  的土沉香成熟个体,每株采集  $2\sim 3$  片叶子,叶片采集后立刻放入装有硅胶的密封袋内带回实验室。本研究共采集到 83 株土沉香叶样。

### 1.2 遗传多样性检测

利用中国科学院华南植物园王峥峰所在实验室筛选到的 18 个微卫星体对五桂山 83 株土沉香样品进行 PCR 扩增。这 18 个微卫星体采用限制性酶切位点相关 DNA 测序(restriction site-associated DNA sequencing, RAD-seq)方法获得。具体步骤如下,首先利用中国科学院植物园采集的一个土沉香样品,通过 *EcoR* I 内切酶对它的总 DNA 进行酶切。收集  $350\sim 500 bp$  片段进行建库。再利用 Illumina HiSeq 2500 测序仪进行双端  $150 bp$  测序。对测序结果进行过滤、拼接。对拼接后的序列参考王峥峰(2016)方法进行微卫星体序列的查找。对查找到的微卫星体序列,我们随机挑选其中 100 个序列进行引物设计,多态性分析。最终确定 18 个有稳定多态性的微卫星体进行土沉香遗传多样性研究。每个微卫星体 PCR 扩增均使用  $20 \mu L$  反应体系,体系如下: $2 \mu L 10\times PCR$  缓冲液,  $0.5 mmol \cdot L^{-1}$  dNTPs, 正反引物各  $0.4 \mu mol \cdot L^{-1}$ , 约  $50 ng$  DNA 模板,  $1 U Taq$  酶。PCR 反应程序如下:起始  $5 min 95^{\circ}C$  变性,随后 35 个循环进行  $94^{\circ}C$  变性  $30 s$ ,  $55^{\circ}C$  退火  $30 s$ ,  $72^{\circ}C$  延伸  $45 s$ , 35 个循环结束后  $72^{\circ}C$  延伸  $10 min$ 。每个微卫星体均使用相同的退火温度。PCR 扩增产物在 ABI 3730 全自动测序仪上用毛细管电泳法进行微卫星体分型分析。

### 1.3 数据分析

土沉香遗传多样性分析:利用 GenAlEx 6.501 (Peakall & Smouse, 2012)计算五桂山土沉香种群各位点等位基因数,各位点及其种群整体观测杂合度(Observed-heterozygosity)和期望杂合度(Expected-heterozygosity);利用 Genepop-4.5.1 软件(Rousset, 2008)计算种群各位点及其种群整体近

表 1 土沉香 18 个微卫星位点和种群遗传多样性及其与同属、同一生活史物种的比较

Table 1 Genetic diversity of eighteen microsatellite loci in *Aquilaria sinensis* and its comparison with species in the same genus or with the same life history traits

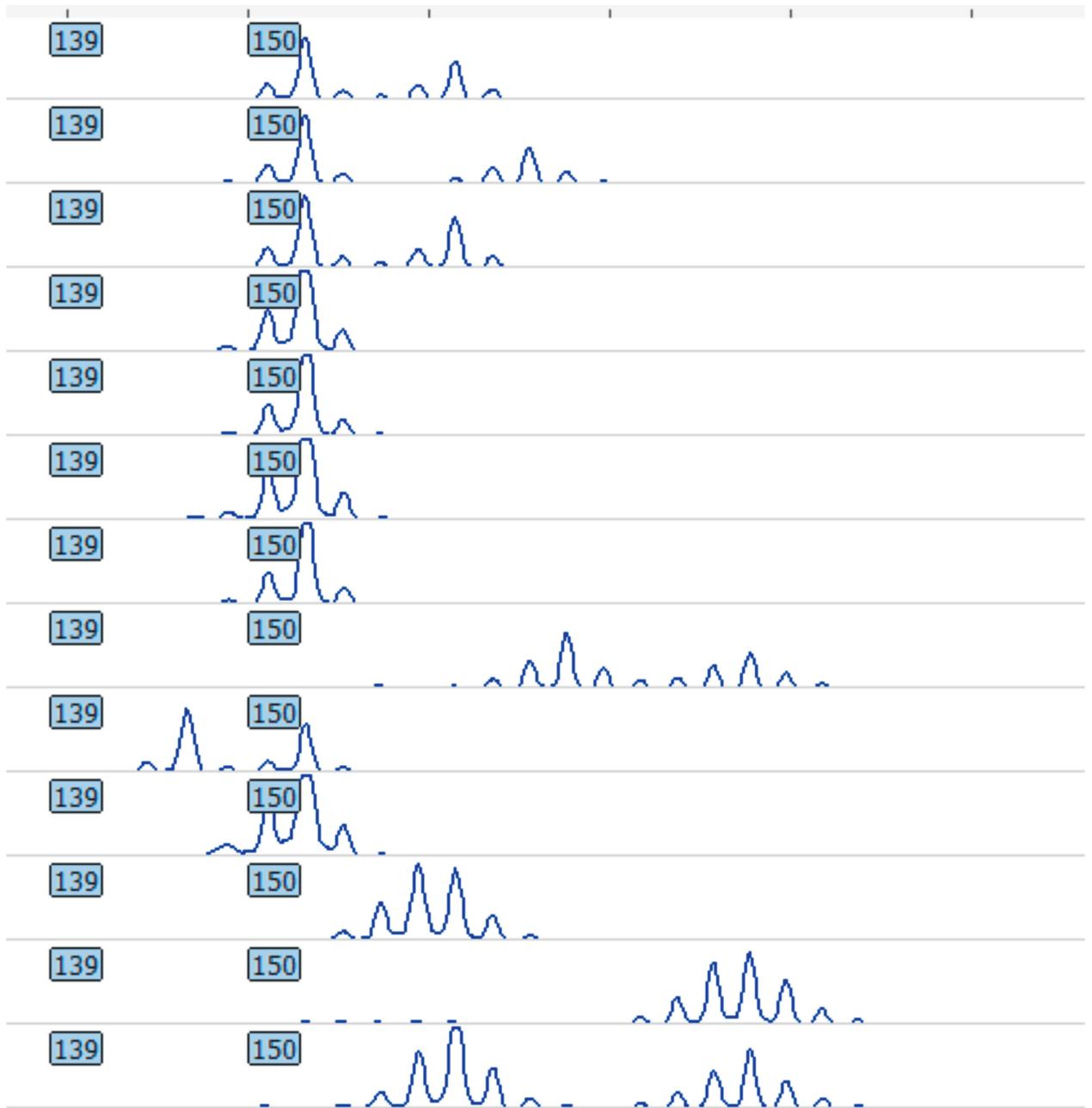
位点 Locus	等位基因数 Number of alleles (A)	观测杂合度 Observed- heterozygosity ( $H_o$ )	期望杂合度 Expected- heterozygosity ( $H_E$ )	近交系数 Inbreeding index ( $f$ )	GenBank 库号 GenBank accession No.
TCX-10	5	0.602	0.574	-0.049 3	KY304005
TCX-12	6	0.795	0.716	-0.111 3	KY304006
TCX-16	6	0.253	0.283	0.105 2	KY304007
TCX-18	5	0.578	0.564	-0.025 9	KY304008
TCX-20	5	0.663	0.648	-0.022 6	KY304010
TCX-22	3	0.049	0.094	0.484 1 *	KY304011
TCX-27	4	0.488	0.465	-0.050 1	KY304012
TCX-39	5	0.482	0.507	0.050 2	KY304014
TCX-40	13	0.831	0.800	-0.039	KY304015
TCX-42	3	0.482	0.462	-0.044 4	KY304016
TCX-43	4	0.639	0.565	-0.131 9	KY304017
TCX-53	3	0.241	0.240	-0.004 6	KY304018
TCX-61	4	0.627	0.713	0.121 8	KY304020
TCX-64	4	0.446	0.475	0.061	KY304021
TCX-65	6	0.732	0.723	-0.011 8	KY304022
TCX-67	5	0.506	0.520	0.027 4	KY304023
TCX-83	2	0.518	0.498	-0.039 8	KY304027
TCX-91	3	0.488	0.556	0.123 3	KY304028
种群整体 (Total)	—	0.523	0.522	-0.002	—
同属其它物种 (Species in the same genus)					
马来沉香 <i>Aquilaria malaccensis</i> (Singh et al, 2015) <sup>a</sup>		0.811	0.597		
马来沉香 <i>Aquilaria malaccensis</i> (Tnah et al, 2012)		0.568	0.545		
同一生活史物种 (Species with the same life history traits) <sup>b</sup> (Nybom, 2004)					
长年生物种 Long-lived perennial		0.63	0.68		
区域分布物种 Regional distributed species		0.65	0.65		
远交物种 Outercrossing species		0.63	0.65		
种子传播方式 Seed dispersal mode					
重力传播物种 Species by gravity		0.50	0.47		
摄食传播物种 Species by ingestion		0.72	0.73		
演替中期种 Mid-successional species		0.60	0.63		

注: \* 显著度 Bonferroni 纠正后  $P < 0.05$ ; <sup>a</sup> 三个种群的平均值; <sup>b</sup> 同一生活史物种结果均为种群水平结果。

Note: \*  $P < 0.05$  after the Bonferroni correction; <sup>a</sup> Average values from three populations; <sup>b</sup> Within-population results for the species with the same life history traits.

交系数  $f$  (Weir & Cockerham, 1984), 检测其显著性, 并采用 Bonferroni 纠正 (Bonferroni correction)

的方法进行多重比较下的显著性水平调整 (Holm, 1979)。  $f$  值反映种群是否处于哈迪—温伯格平衡



注：图中数字为特定 DNA 分子量对应的片段大小。

Note: Numbers in the figure indicate the fragment sizes where the particular DNA markers located.

图 1 五桂山土沉香部分个体在 TCX-40 位点的毛细管电泳结果

Fig. 1 Electropherogram in samples of *Aquilaria sinensis* from Wuguishan in locus TCX-40 using capillary electrophoresis

(Hardy-Weinberg Equilibrium), 一种自由交配状况。如果种群处于这一平衡,  $f$  值为 0。考虑到其中一个位点 TCX-22 明显偏离哈迪—温伯格平衡(见结果与分析), 在下面三个分析中, 我们去除了 TCX-22 位点。

种群瓶颈效应利用 BOTTLENECK-1.2.02 (Piry et al, 1999) 进行分析。在微卫星突变模型选择上, 这里选择两相突变模型 (Two-phased model of mutation), 用威尔科克森符号秩检验 (Wilcoxon Signed-Ranks Test) 法进行瓶颈效应显著度检测。

个体间亲缘关系利用 ML-relate (Kalinowski et al, 2006) 软件进行分析。ML-relate 软件通过计算两个个体间的亲缘系数, 检测个体之间如下亲缘关系: 亲本—子代 (PO, parent-offspring) 关系, 全同胞 (FS, full-siblings) 关系, 半同胞 (HS, half-siblings) 关系和无关系 (U, unrelated) 四种类型。

种群扩张采用 kgtests 软件 (Bilgin, 2007) 中的  $K$ -test 方法进行分析。这一方法的原理是对于扩张的种群, 它的等位基因大小分布呈单峰性 (Unimodal); 而对于种群大小恒定的种群, 其等位基因大小分布呈多峰性 (Multimodal)。 $K$ -test 中的  $k$  度量峰度 (Kurtosis) 状态, 中间值为 0。位点  $k$  值小于 0 表示有种群扩张的情形。如果所有检测位点中  $k$  值小于 0 的位点比例显著占优, 就表示种群有扩张历史。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传多样性

18 个微卫星体在五桂山土沉香种群中分别扩增出 2~13 个等位基因, 观测杂合度在 0.049~0.831 之间, 期望杂合度在 0.094~0.800 之间。近交系数检测结果表明除了 TCX-22 这个位点偏离哈迪—温伯格平衡, 其余位点均处于哈迪—温伯格平衡状态 (表 1)。图 1 为五桂山部分土沉香个体在 TCX-40 位点的毛细管电泳结果。

种群水平的遗传多样性结果表明, 五桂山土沉香观测杂合度和期望杂合度分别是 0.523 和 0.522, 非常接近。近交系数也接近 0, 表明种群整体处于哈迪—温伯格平衡。

### 2.2 瓶颈效应分析

利用微卫星体的两相突变模型, 瓶颈效应分析中威尔科克森符号秩检验结果是  $P=0.189$ , 结果不显著, 表明五桂山土沉香没有经历瓶颈效应。

### 2.3 个体间亲缘关系分析

55 个个体对表现为亲本—子代关系, 占全部个体对的 1.616% (55/3 403), 41 个个体对表现为全同胞关系, 占全部个体对的 1.205% (41/3 403), 523 个个体对表现为半同胞关系, 占全部个体对的 15.369% (523/3 403)。其余 2 784 个

个体对表现为没有亲缘关系, 占 81.810%。

### 2.4 种群扩张分析

种群扩张分析的  $k$ -test 结果显示, 检测的 17 个微卫星体位点中, 13 个位点  $k$  值小于零 ( $P=0.018$ ), 表明五桂山土沉香历史上有种群扩张情形。

## 3 讨论与结论

利用 ISSR (inter-simple sequence repeat) 和 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 不同分子遗传标记, 贾文杰等 (2010)、杨春勇等 (2013) 和黄久香等 (2014) 都对土沉香遗传多样性开展过一些研究。结果表明土沉香物种水平上拥有较高的遗传多样性, 但种群水平遗传多样性相对低些。由于 ISSR 和 AFLP 分子遗传标记为显性遗传标记, 无法区分杂合体, 限制了其在物种交配系统、亲本分析等领域的应用。但由于其能揭示丰富的遗传多样性信息, 因此 ISSR 和 AFLP 分子遗传标记还是有其优越性。

本研究通过文献查找, 利用微卫星体分子标记, 对土沉香同属植物开展的研究只有马来沉香 (*Aquilaria malaccensis*)。而 Singh et al (2015) 的研究混合了三个种群观测杂合度和期望杂合度结果, 因此这两个值的结果都较高于五桂山土沉香种群遗传多样性。但与 Tnah et al (2012) 对马来沉香种群水平的遗传多样性结果相比, 五桂山土沉香遗传多样性的两个指标略低。

本研究中, 与同一生活史其它物种相比, 五桂山土沉香种群遗传多样性两个指标 (观测杂合度和期望杂合度) 都较低, 其观测杂合度和期望杂合度只高于种子重力传播的物种。贾文杰等 (2010) 研究认为, 土沉香的种子兼具重力传播和摄食传播两种方式。土沉香种子褐色, 卵球形, 长约 1 cm, 宽约 5.5 mm。土沉香种子具有拟态性, 种子附属物可分泌化学信号诱导胡蜂取食, 胡蜂取食时同时协助土沉香种子扩散 (胡超, 2012; Chen et al, 2016)。对同属其它物种马来沉香 (*A. malaccensis*) 种子扩散研究表明, 黄腰胡蜂 (*Vespa affinis*) 是其唯一种子传播者, 最长可以协助马来沉香种子扩散到 500 m 以外 (Manohara, 2013)。考虑到土沉香种子的这种特性,

其种子传播方式应该归为摄食传播。因此,在种子传播方式上,土沉香遗传多样性应该和种子摄食传播物种相比。本研究中,种子摄食传播物种的遗传多样性两个指标,观测杂合度和期望杂合度,分别为0.72和0.73,高于五桂山土沉香种群这两个遗传多样性指标。综上,我们可以看出,五桂山土沉香种群遗传多样性略低,但总体并没有很大下降。同时,从近交系数 $f$ 结果看,其值约为0,反映种群整体呈随机交配状况。

由于缺乏历史资料,虽然现有五桂山土沉香种群散布在次生林中,并且有些个体胸径级较大,如胸径为33.9 cm,但其原始性尚无法判断。虽然从现代规模化种植角度看,这些散生的土沉香个体不像是人为种植的,但考虑到中山市自唐宋以来是传统的土沉香种植区,存在大规模的人工种植现象,因此五桂山现有的土沉香很有可能是当年人工种植的土沉香种子扩散后萌发而成。

人工栽培会导致栽培物种遗传多样性的明显降低,这在很多栽培作物中有报道(Fineschi et al, 2000; Lumaret et al, 2004; Allan et al, 2008; Li et al, 2017; Sahu & Chattopadhyay, 2017)。主要原因是人们在进行人工栽培中会选择某种优良性状的个体作为母系,然后后代均从这些少数母系繁育而来,从而导致栽培群体来源单一,遗传多样性降低。同时,从以往对土沉香不同种群遗传分化的结果看,土沉香种群间存在较大的遗传分化。如黄久香等(2014)对东莞及其邻近地区的土沉香种群的遗传分化研究结果为0.227;而贾文杰等(2010)对广东、广西、云南以及海南共8个种群的研究结果表明,土沉香种群间的遗传分化达0.443。理论研究表明(Wright, 1978),当遗传分化值为0~0.05之间,种群间遗传分化程度低;当遗传分化值为0.05~0.15之间,种群间的遗传分化程度中等;当遗传分化值为0.15~0.25之间,种群间的遗传分化程度较大;当遗传分化值大于0.25时,种群间的遗传分化程度很大。对比以往的结果,土沉香种群间有较大的遗传分化,这导致种群间基因流不畅,降低种群内遗传多样性。因此,理论上,人工栽培和基因流不畅都会导致土沉香种群遗传多样性的降低。然而从我们的研究结果看,五桂山土沉香并没有出现大的

遗传多样性降低。其可能的原因是五桂山地区土沉香人工栽培种植面积较大,种源选择较广,使得五桂山土沉香种群形成没有受到瓶颈效应(个体数量限制)影响。个体间亲缘关系远也证实了这点。虽然没有很大的遗传多样性降低,但从上面的对比分析看,人工选择栽培还是在一定程度上造成五桂山地区土沉香小部分遗传多样性丢失。近年来,有多人次对五桂山地区土沉香资源进行过相关调查,估计其种群数量可达约4万株(梅全喜, 2016),表明这一地区现有土沉香种群生长状况良好,符合我们对种群扩张的检测结果。

综上所述,从现有结果来看,五桂山土沉香种群遗传多样性稍低,种群整体健康,为该地区土沉香保护利用提供了遗传多样性保障。

**致谢** 感谢五桂山保护区护林员在采样中的帮助。

## 参考文献:

- ALLAN G, WILLIAMS A, RABINOWICZ PD, et al, 2008. Worldwide genotyping of castor bean germplasm (*Ricinus communis* L.) using AFLPs and SSRs [J]. Genet Resour Crop Evol, 55(3): 365-378.
- BILGIN R, 2007. Kgtests: a simple excel macro program to detect signatures of population expansion using microsatellites [J]. Mol Ecol Notes, 7: 415-417
- CHEN G, LIU C, SUN W, 2016. Pollination and seed dispersal of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg (Thymelaeaceae): An economic plant species with extremely small populations in China [J]. Plant Divers, 38: 227-232
- FAN FL, DENG YB, FAN W, 2013. The time series analysis and estimation of forest volume in Wugui Mountain of Zhongshan City based on remote sensing and GIS [J]. Guangdong Agric Sci, 40(4): 171-173. [樊风雷, 邓应彬, 樊蔚, 2013. 基于遥感和GIS的中山市五桂山森林蓄积量时间序列分析 [J]. 广东农业科学, 40(4): 171-173.]
- FINESCHI S, TAURCHINI D, VILLANI F, et al, 2000. Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries [J]. Mol Ecol, 9(10): 1495-1503.
- HOLM, S, 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure [J]. Scand J Stat, 6(2): 65-70.
- HU C, 2012. Seed dispersal in *Aquilaria sinensis* by paper wasp [D]. Nanchang: Nanchang University. [胡超, 2012. 胡蜂对白木香种子传播的作用 [D]. 南昌:南昌大学.]
- HUANG JX, LIU XK, YE YC, et al, 2014. Leaf morphology and genetic diversity of *Aquilaria sinensis* in Dongguan and its surrounding areas [J]. Guangdong Agric Sci, 41(3): 153-158. [黄久香, 刘宪宽, 叶永昌, 等, 2014. 东莞与邻近地

- 区土沉香居群的叶形态和遗传多样性分析 [J]. 广东农业科学, 41(3): 153-158.]
- JI WZ, SU B, 1999. Principles and methodologies of genetic diversity studies [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Publishing House. [季维智, 宿兵, 1999. 遗传多样性研究的原理与方法 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社.]
- JIA WJ, LI EX, YANG BY, et al, 2010. Studies on genetic diversity of *Aquilaria sinensis* [J]. J Trop Subtrop Bot, 18(2): 159-164. [贾文杰, 李恩香, 杨柏云, 等, 2010. 白木香遗传多样性研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 18(2): 159-164.]
- JIANG QC, GU JM, WANG JB, et al, 2011. A moth investigation catalogue from Wugui Mountain of Zhongshan Nature Reserve [J]. J Trop Org, 2(2): 172-177. [蒋谦才, 古建明, 王家彬, 等, 2011. 中山市五桂山生态保护区蛾类调查名录 [J]. 热带生物学报, 2(2): 172-177.]
- JIANG QC, LI Q, CHEN JJ, et al, 2005. Wild fruit plant resource in Wuguishan of Zhongshan [J]. Trop For, 6(33): 51-52. [蒋谦才, 黎清, 陈嘉杰, 等, 2005. 中山市五桂山野生水果植物资源调查 [J]. 热带林业, 6(33): 51-52.]
- JIANG QC, TAN ZJ, HE XY, 2006. Investigation of healthful plant resources in Wuguishan, Zhongshan City, Guangdong Province [J]. Subtrop Plant Sci, 35(2): 54-57. [蒋谦才, 谭宗健, 何秀云, 2006. 广东中山市五桂山保健植物调查研究 [J]. 亚热带植物科学, 35(2): 54-57.]
- KALINOWSKI ST, WAGNER AP, TAPER ML, 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship [J]. Mol Ecol Notes, 6: 576-579.
- KETTENRING KM, MERECER KL, REINHARDT AC, et al, 2014. Application of genetic diversity-ecosystem function research to ecological restoration [J]. J Appl Ecol, 51: 339-348.
- LANKAU RA, STRAUSS SY, 2007. Mutual feedbacks maintain both genetic and species diversity in a plant community [J]. Science, 317: 1561-1563.
- LI HY, TSUCHIMOTO S, HARADA K, et al, 2017. Genetic tracing of *Jatropha curcas* L. from its Mesoamerican origin to the world [J]. Front Plant Sci, 8: 1539.
- LI Q, TAN ZJ, JIANG QC, et al, 2011. A butterfly catalogue of insects investigation from Wugui Mountain of Zhongshan Nature Reserve [J]. Heilongjiang Agric Sci, (9): 60-63. [黎清, 谭宗健, 蒋谦才, 等, 2011. 中山五桂山生态保护区蝶类昆虫调查名录 [J]. 黑龙江农业科学, (9): 60-63.]
- LIN JX, TAN ZJ, WANG JB, et al, 2006. Investigation of edible wild plants resources in Wuguishan, Zhongshan City [J]. Guangdong For Sci and Technol, 22(2): 42-45. [林俊新, 谭宗健, 王家彬, 等, 2006. 中山市五桂山野菜植物资源调查 [J]. 广东林业科技, 22(2): 42-45.]
- LUMARET R, OUAZZANI N, MICHAUD H, et al, 2004. Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean basin [J]. Heredity, 92: 343-351.
- MANOHARA TN, 2013. Wasp-mediated seed dispersal in agarwood plant (*Aquilaria malaccensis*), a critically endangered and overexploited species of North East India [J]. Curr Sci, 105: 298-299
- MEI QX, 2016. Fragrant medicines—*Aquilaria sinensis* [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine. [梅全喜, 2016. 香药——沉香 [M]. 北京: 中国中医药出版社.]
- MEI QX, LI HC, WANG KY, 2007. The original place of *Aquilaria sinensis* in Zhongshan and its developments [J]. Shizhen J Trad Chin Med Res, 18(8): 2049-2051. [梅全喜, 李汉超, 汪科元, 2007. 南药中山沉香的产地考证与发展构想 [J]. 时珍国医国药, 18(8): 2049-2051.]
- MEI QX, LI HC, WANG KY, et al, 2011. The medical history of *Aquilaria sinensis* and its original place [J]. Pharm Today, 21(1): 3-5. [梅全喜, 李汉超, 汪科元, 等, 2011. 南药沉香的药用历史与产地考证 [J]. 今日药学, 21(1): 3-5.]
- NYBOM H, 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Mol Ecol, 13: 1143-1155.
- PEAKALL R, SMOUSE PE, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update [J]. Bioinformatics, 28: 2537-2539.
- PIRY S, LUIKART G, CORNUET JM, 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data [J]. J Hered, 90: 502-503.
- ROUSSET F, 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux [J]. Mol Ecol Resour, 8: 103-106.
- SAHU KK, CHATTOPADHYAY D, 2017. Genome-wide sequence variations between wild and cultivated tomato species revisited by whole genome sequence mapping [J]. BMC Genom, 18: 430.
- SHI LM, 1993. Genetic diversity and its preservation [J]. Chin Biodiv, 1(1): 23-31.
- SINGH P, SHARMA H, NAG A, et al, 2015. Development and characterization of polymorphic microsatellites markers in endangered *Aquilaria malaccensis* [J]. Conserv Genet Resour, 7: 61-63.
- TNAH LH, LEE CT, LEE SL, et al, 2012. Isolation and characterization of microsatellite markers for an important tropical tree, *Aquilaria malaccensis* (Thymelaeaceae) [J]. Am J Bot, e431-433.
- WANG ZF, 2016. Fundamental of molecular ecology and data analysis [M]. Beijing: Science Press. [王峰峥, 2016. 分子生态学与数据分析基础 [M]. 北京: 科学出版社.]
- WEIR B, COCKERHAM C, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure [J]. Evolution, 38: 1358-1370.
- WRIGHT S, 1978. Evolution and genetics of populations [M]. Chicago: University of Chicago Press.
- YANG CY, LI HT, LI XL, et al, 2013. Comparative analysis of cultivated *Aquilaria* Lam. using ISSR and AFLP [J]. J Plant Gene Resour, 14(3): 553-559. [杨春勇, 李海涛, 李学兰, 等, 2013. 栽培沉香遗传多样性的 ISSR 和 AFLP 分析比较 [J]. 植物遗传资源学报, 14(3): 553-559.]
- ZHANG YS, TAN ZJ, LI L, et al, 2012. Catalogue of Hymenoptera in Wugui Mountain Nature Reserve of Zhongshan City [J]. Hubei Agric Sci, 51(1): 64-66. [张玉山, 谭宗健, 李琳, 等, 2012. 中山五桂山生态保护区膜翅目昆虫名录 [J]. 湖北农业科学, 51(1): 64-66.]