文章编号: 1674 − 7054(2021)01 − 0025 − 08

海南岛鸟巢蕨自然种群遗传多样性 SRAP 分析

侯祥文[1,3], 徐诗涛[2], 王德立[3], 梁靖雯[2], 司更花[2]
(1. 海南大学 林学院, 海口 570228; 2. 海南大学 园艺学院, 海口 570228;
3. 中国医学科学院 药用植物研究所 海南分所, 海口 570311)

摘　要: 为揭示鸟巢蕨(*Asplenium nidus*)自然种群的遗传多样性和亲缘关系, 促进野生鸟巢蕨资源有效保护和利用, 本研究以海南岛保护区自然分布的鸟巢蕨为对象, 利用 SRAP 分子标记技术, 采用 UPGMA 方法对海南岛 6 个种群 96 份鸟巢蕨样本进行聚类分析。结果表明: (1) 鸟巢蕨 10 对引物共扩增出 184 个位点, 其中多态位点 174 个, 多态位点百分率为 94.57%, 各种群间的多态位点百分比(PPB)存在较大差异, SRAP 检测到的种群平均多态位点百分比为 85.15%。鸟巢蕨种群间遗传变异程度范围较大, 各种群均具有较高遗传多样性水平。(2) 种群内部遗传分化发生比例为 86.94%, 而种群间遗传分化发生比例为 13.06%, 证明种群间存在一定水平遗传分化。(3) 鸟巢蕨 6 个种群平均遗传相似度为 0.922 4, 平均遗传距离为 0.080 9。其中, BW 和 EXL 遗传距离最近, LMS2 和 LMS3 遗传距离最远, 分别为 0.050 8 和 0.116 6。鸟巢蕨野外种群遗传距离 UPGMA 聚类分析结果显示, 地理位置较近的 BW 和 EXL 聚类在一起, 说明两者间基因流动通畅; 同一地区 LMS1 和 LMS3 聚类在一起; 而黎母山地区 LMS2 与其余种群遗传距离最大, 遗传分化最显著, 说明 SRAP 标记在鸟巢蕨种群间具有丰富多态性, 该结果对揭示鸟巢蕨亲缘关系具有重要意义, 为保护工作提供了指导。由于鸟巢蕨野外生境受到不同程度破坏, 建议就地保护为主, 在种群遗传多样性较高区域——黎母山区域建立级别更高的自然保护区, 即尽快建成热带雨林国家公园, 这有利于鸟巢蕨自然生境和种群恢复与扩大, 促进热带雨林保育和物种多样性可持续发展。

关键词: 鸟巢蕨; SRAP; 海南岛; 遗传多样性; 聚类分析
中图分类号: Q 949.36; Q 943.2　　**文献标志码:** A
引用格式: 侯祥文, 徐诗涛, 王德立, 等. 海南岛鸟巢蕨自然种群遗传多样性 SRAP 分析 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(1): 25−32. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswxb.2021.01.004

鸟巢蕨 (*Asplenium nidus*) 是铁角蕨科 Aspleniaceae 巢蕨属的一个种, 又名山苏花, 是热带雨林大型附生植物[1]。原生于亚洲东南部、澳大利亚东部、印度尼西亚、印度和非洲东部等地[2−3]。《中国植物志》记载我国有鸟巢蕨分布于台湾、福建、香港、广东、广西、海南、湖南、四川、贵州、云南和西藏等省份和地区。鸟巢蕨植物不仅可以丰富森林生物多样性, 还可调节森林生态系统的水分与养分循环, 且具有药用、食用与园林绿化价值。近年来, 由于人为活动干扰, 野生鸟巢蕨被大量采集, 生境缩小且破碎化严重, 导致其遗传多样性降低。加上种间杂交严重, 导致遗传背景错综复杂, 已影响到其品种改良、新品种培育、保护和开发利用。因此, 加强对鸟巢蕨遗传多样性与进化研究对鸟巢蕨种质资源保护和利用以及育种和遗传改良具有重要意义。SRAP(sequence-related amplified polymorphism) 是相关序列扩增多态性的简称, 利用双引物设计对基因的 ORFS(Open Reading Frames, 开放阅读框) 进行区域扩增是该技术特点, 因不同物种内含子、启动子与间隔区的长度不同而产生多态性[4−6]。SRAP 技术具有操作方便、多态性丰富、重复性好、易于测序、速度快和成本低等特性, 被广泛运用于动物、植物、微生物的品种鉴定、遗传图谱构建、遗传多样性检测、基因定位和比较基因组学等研究[7−8]。SRAP 标记通过直接分析遗传物质多态性作

收稿日期: 2019 − 08 − 10　　**修回日期:** 2020 − 12 − 16
基金项目: 国家自然科学基金项目(31660229); 昌江黎族自治县花卉产业发展规划(2019—2025)(ZZZ002024125)
第一作者: 侯祥文(1994−), 男, 海南大学林学院 2018 级硕士研究生. E-mail: 984394019@qq.com
通信作者: 徐诗涛(1968−), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师. 研究方向: 热带观赏园艺. E-mail: xutaohn@qq.com

为不同种群划分依据更为可行和客观，能够较好地开展遗传多样性分析，可避免因季节性生理生化差异和不同发育阶段而影响指标的准确性[9－10]。因此，可通过分子标记技术分析鸟巢蕨亲缘关系，得到更加科学和稳定的分析结果。海南岛是鸟巢蕨分布中心之一[11－12]，野生种群集中分布于霸王岭、俄贤岭、黎母山和五指山等热带雨林区域。不同种群间的鸟巢蕨在叶形、株高、孢子量、巢基大小方面存在一定差异[13－14]。为揭示鸟巢蕨自然种群状况，促进野生鸟巢蕨资源有效保护和利用，本研究采用 SRAP 标记技术，对海南岛霸王岭、俄贤岭、黎母山和五指山 6 个鸟巢蕨自然种群进行遗传多样性分析，旨在探明海南岛鸟巢蕨种群之间遗传关系、亲缘关系，进而揭示海南岛不同地理环境对鸟巢蕨遗传多样性及种群分化的影响，为鸟巢蕨保育和遗传资源利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 于 2011 年 5 月−8 月及 2019 年 3 月−4 月，在海南岛霸王岭、俄贤岭、黎母山及五指山 6 个自然种群进行采样，每个种群范围均>2 km^2，6 个自然种群相互间地理距离>10 km。每个采集种群内采样个体间间隔距离>1 m。共采集 96 份植株叶片样本，硅胶干燥后，带回实验室，提取 DNA。各种群地理位置、生境及采样个体数详见表 1。

表 1 海南岛鸟巢蕨 6 个研究种群的地理位置与生境

Tab. 1 Location, habitat, and sample size of the 6 populations of *Asplenium nidus* in Hainan Island

种群 Population	地点 Location	生境 Habitat	样本数/份 Sampling/No.	经度(E) Longitude	纬度(N) Latitude	海拔/m Altitude
BW	霸王岭 (Bawangling)	雨林沟谷 石生、附生	16	109°12′	19°06′	755 ~ 770
EXL	俄贤岭 (Exianling)	雨林沟谷 石生、附生	16	109°38′	18°53′	900 ~ 1 000
LMS1	黎母山 (Limushan 1)	雨林沟谷 石生、附生	8	109°42′	19°10′	740 ~ 760
LMS2	黎母山 (Limushan 2)	雨林沟谷 石生、附生	7	109°25′	19°26′	720 ~ 740
LMS3	黎母山 (Limushan 3)	雨林沟谷 石生、附生	23	109°18′	19°38′	700 ~ 750
WZS	五指山 (Wuzhishan)	雨林沟谷 石生、附生	26	109°41′	18°54′	800 ~ 900

1.2 DNA 提取 采用北京天根生物有限公司生产的新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)提取鸟巢蕨叶片 DNA，用 w=1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，图 1 为鸟巢蕨种群基因组 DNA 电泳图。提取样品基因组 DNA 用核酸微量测定仪稀释至一致的质量浓度(50 mg·L^{-1})，置于−20 ℃ 下保存备用。

1.3 SRAP 扩增与检测分析 根据 LI 等[15] 的方法，设计正向引物 17 个，反向引物 20 个，由北京三博生物技术有限公司合成。PCR 扩增反应使用 TC-512PCR 仪(Techne, Ltd.)。PCR 扩增体系：1U 的 *Taq* DNA 酶，1.5 mmol·L^{-1} 的 Mg^{2+}，0.20 mmol·L^{-1} 的 dNTP(Fermentas Biotec.) 和 25 ng 的 DNA，0.5 μmol·L^{-1}

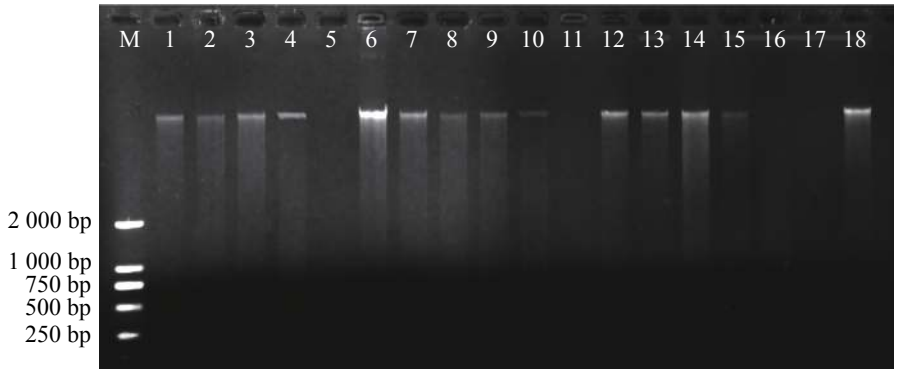

图 1 海南岛 6 个鸟巢蕨种群基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 The electrophoretogram of genomic DNA of 6 populations of *Asplenium nidus* in Hainan Island

的引物。PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 sec, 52 ℃ 退火 30 sec, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 终延伸 10 min, 4 ℃ 保存[16]。扩增产物在 w=6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上(65 w 恒定功率)电泳 2 ~ 2.5 h。电泳完毕后, 进行银染, 通过成像仪拍照并保存。

1.4　数据统计分析　将 SRAP 记录的电泳图进行人工读带, 由图 1 可得, 以同一位点有带记作“1”, 无带记作“0”, 仅记录清晰、稳定且长度在 300 ~ 2 500 bp 的扩增条带, 形成 0-1 矩阵二元数据输入电脑。

采用 POPGENE32 软件衡量 SRAP 水平上遗传变异程度, 对全部种群和各个种群分别进行遗传参数分析, 分别对有效等位基因数 (Ne, effective number of allele)、等位基因观察值 (Na, number of allele)、多态位点百分率 (PPB, percentage of polymorphic bands)、Nei’s 基因多样性 (He, Nei’s genetic diversity)、Shannon 信息指数 (Ho, Shannon’s information index)[16 − 17]、种群总基因多样度 (Ht, total gene diversity)、种群内基因多样度 (Hs, gene diversity within populations)、种群间的基因流 (N, geneflow), 种群间遗传分化系数 (Gst, coefficient of population differentiation)、Nei’s 无偏差遗传距离 (D, Nei’s genetic distance) 和遗传一致度 (I, genetic identity) 等参数进行计算[18]。

应用 GenAlEx v.6(Genetic Analysis in Excel) 软件[19] 对种群内遗传变异和种群间遗传变异进行分子变异分析 (AMOVA), 计算遗传变异在种群内和种群间分布。Shannon 信息指数 H_O 由如下公式计算:

$$H_O = -\sum Pi \log_2 P_i ,$$

式中, H_O 为 Shannon 信息指数, P_i 为第 i 条带的表型频率。

遗传分化系数(coefficient of genetic differentiation, Gst)用来估算种群间的遗传分化程度, 即种群间遗传多样性占总遗传多样性的比例。

$$Gst = \frac{(Ht - Hs)}{Ht};\ Ht = 1 - \sum_{j=1}^{m} r_j^2;\ Hs = \sum_{j=1}^{m}\left(1 - \sum_{j=1}^{mi} q_{ij}^2\right)\Big/ n ,$$

式中, Gst 为遗传分化系数, Ht 为种群的遗传多样度, Hs 为各种群内的基因多样度, m 为该位点上的等位基因, n 为居群总数, r_j 为该位点上第 j 个等位基因在总种群中的平均频率, q_{ij} 为第 i 个种群在该位点上第 j 个等位基因频率, m_i 为第 i 个种群在该位点上的等位基因数。

基因流(gene flow)用来估算种群间基因交流程度, 为每个世代在种群间迁移的个体数, 是通过遗传分化系数来估算的:

$$N_{\mathrm{m}} = \frac{0.25(1 - Gst)}{Gst} ,$$

式中, N_m 为基因流, N 为有效种群大小; m 为种群每代迁移率; Gst 为遗传分化系数。

根据 Nei’s 遗传距离,使用 NTSYS-pc 2.1 软件对种群进行 UPGMA 聚类分析, 样本数为 85。

2　结果与分析

2.1　海南岛鸟巢蕨自然种群的遗传多样性　利用 17 个正向引物与 20 个反向引物共 340 对引物组合进行扩增, 筛选出 10 对条带清晰、稳定性高、特异性好且多态性丰富的 PCR 扩增产物用于鸟巢蕨的遗传多样性分析[15]。其中, 正向和反向引物序列见表 2, 10 对引物组合为: ME3-EM3、ME4-EM10、ME5-EM8、ME6-EM16、ME5-EM7、ME10-EM10、ME14-EM6、ME16-EM14、ME16-EM10、ME3-EM4。

引物用于对海南岛鸟巢蕨 6 个野生种群共 96 个个体进行 PCR 扩增, 由扩增结果(图 2)可看出, 一共扩增出 184 个清晰稳定的条带, 筛选 6 条清晰条带进行分析, 其中 174 条具有多态性, 多态位点百分率为 94.57%。从图 1 可看出, 每个引物扩增出的条带为 5 ~ 9 条, 平均条带数为 6.9。条带分子量在 250 ~ 2 000 bp 之间, 而表 3 里的各种群间多态位点百分率存在较大的差异。基于 SRAP 分子标记的鸟巢蕨物种水平多态位点百分比 (*PPB*) 为 94.57%, SRAP 检测到的种群多态位点百分比例 (*PPB*) 在 76.09%(LMS2 种群) ~ 94.57%(LMS3 种群) 之间, 平均为 85.15%, 鸟巢蕨种群间遗传变异程度较大 (76.09% ~ 94.57%), 说明各种群均具有较高的遗传多样性水平。

表 2 SRAP 分析中使用的正向和反向引物序列

Tab. 2 Forward and Reverse Primer sequences used in SRAP analysis

Forward Primer 5′−3′	Reverse Primer 5′−3′
ME1 TGAGTCCAAACCGGAGC	EM1 GACTGCGTACGAATTAAT
ME2 TGAGTCCAAACCGGATA	EM2 GACTGCGTACGAATTTGC
ME3 TGAGTCCAAACCGGAAT	EM3 GACTGCGTACGAATTGAC
ME4 TGAGTCCAAACCGGACC	EM4 GACTGCGTACGAATTAAC
ME5 TGAGTCCAAACCGGAAG	EM5 GACTGCGTACGAATTTGA
ME6 TGAGTCCAAACCGGTAA	EM6 GACTGCGTACGAATTGCA
ME7 TGAGTCCAAACCGGTGC	EM7 GACTGCGTACGAATTGAG
ME8 TGAGTCCAAACCGGTCC	EM8 GACTGCGTACGAATTCTG
ME9 TGAGTCCAAACCGGTAG	EM9 GACTGCGTACGAATTGTC
ME10 TGAGTCCAAACCGGTTG	EM10 GACTGCGTACGAATTCAG
ME11 TGAGTCCAAACCGGTGT	EM11 GACTGCGTACGAATTCCA
ME12 TGAGTCCAAACCGGTCA	EM12 GACTGCGTACGAATTCAC
ME13 TGAGTCCAAACCGGGAC	EM13 GACTGCGTACGAATTGCC
ME14 TGAGTCCAAACCGGGTA	EM14 GACTGCGTACGAATTGGT
ME15 TGAGTCCAAACCGGGGT	EM15 GACTGCGTACGAATTCGG
ME16 TGAGTCCAAACCGGCAG	EM16 GACTGCGTACGAATTATG
ME17 TGAGTCCAAACCGGCTA	EM17 GACTGCGTACGAATTAGC
	EM18 GACTGCGTACGAATTACG
	EM19 GACTGCGTACGAATTTAG
	EM20 GACTGCGTACGAATTTCG

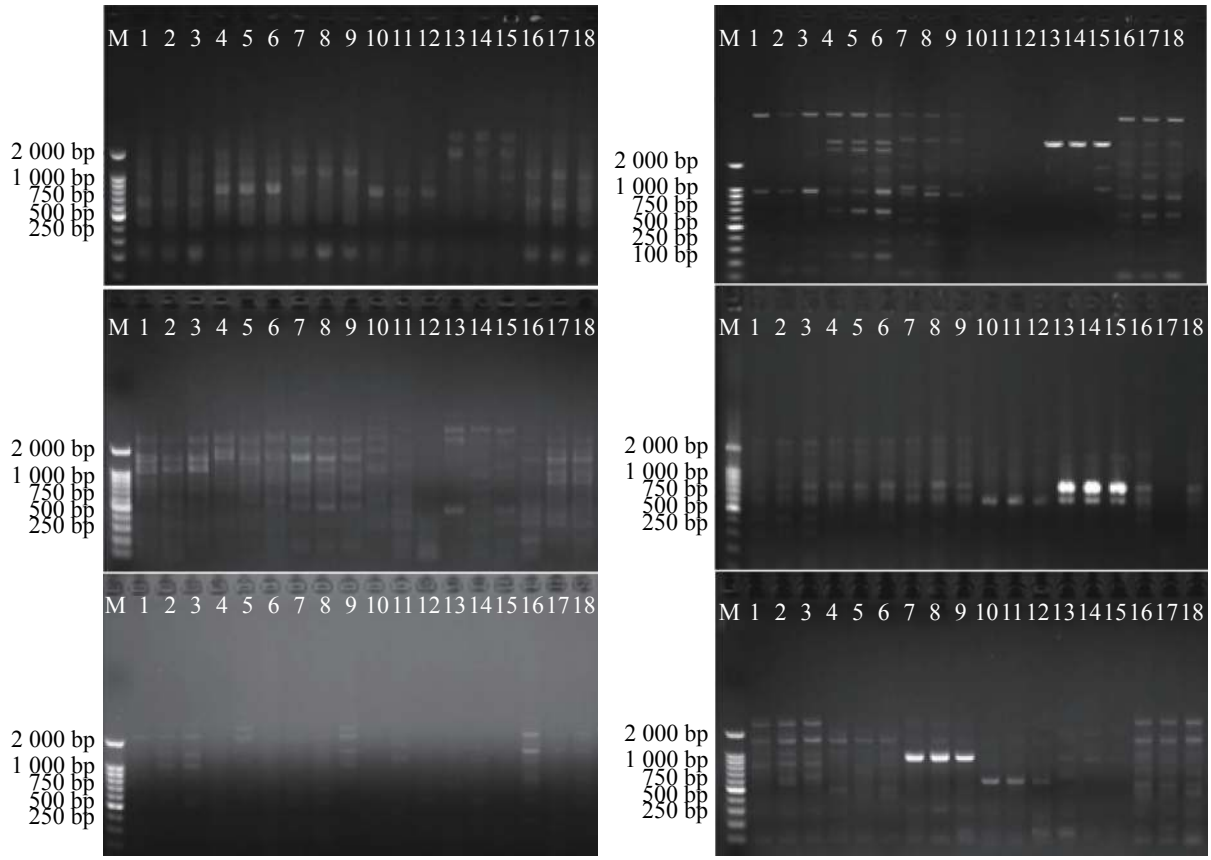

图 2 6 个鸟巢蕨鸟巢蕨种群的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of six populations of *Asplenium nidus*

表 3　鸟巢蕨 6 个自然种群 SRAP 标记遗传多样性 (平均值±标准差)

Tab. 3　Genetic diversity (Mean±SE) of 6 natural populations of *Asplenium nidus* based on SRAP markers

种群 Population	等位基因观察值(*No*) Observed number of alleles	有效等位基因数(*Ne*) Effective number of alleles	Nei基因多样性(*He*) Nei's genetic diversity	Shannon信息指数(*Ho*) Shannon's information index	多态位点数 Number of polymorphic loci	多态位点百分率(*PPB*) Percentage of polymorphic loci/%
BW	1.815 2±0.389 2	1.479 9±0.350 9	0.282 2±0.181 4	0.422 7±0.251 0	150	81.52
EXL	1.853 3±0.354 8	1.534 3±0.349 1	0.309 4±0.171 4	0.459 7±0.238 1	157	85.33
LMS1	1.853 3±0.354 8	1.490 1±0.335 0	0.291 9±0.168 6	0.440 3±0.230 1	157	85.33
LMS2	1.760 9±0.427 7	1.522 4±0.377 1	0.296 1±0.193 3	0.434 6±0.269 6	140	76.09
LMS3	1.945 7±0.227 3	1.533 2±0.227 3	0.322 5±0.137 8	0.488 1±0.179 6	174	94.57
WZS	1.880 4±0.325 3	1.508 7±0.319 8	0.304 0±0.160 7	0.457 7±0.219 1	162	88.04
Population level	1.851 5±0.346 5	1.511 4±0.326 5	0.301 0±0.168 9	0.450 5±0.231 3	156.7	85.15
Species level	1.945 7±0.227 3	1.589 3±0.286 4	0.347 5±0.132 9	0.518 1±0.172 8	174	94.57

2.2　鸟巢蕨的遗传分化　POPGENE 软件分析结果表明, 种群间和种群内均存在一定遗传变异, 但主要发生在种群内部。种群总基因多样度 (*Ht*) 为 0.346 2±0.018 3, 其中, 种群内基因多样度 (*Hs*) 为 0.301 0±0.014 2, 即 86.94% 的遗传分化发生在种群内部; 种群间遗传分化系数 (*Gst*) 为 0.130 6, 即种群间遗传分化为 13.06%, 说明鸟巢蕨种群间遗传分化水平较高, 且遗传变异主要发生在种群内部。种群间基因流 N_m=1.664 2, 表明鸟巢蕨之间基因流动畅通。

AMOVA 分析表明, 遗传变异以居群内变异为主, 此分析结果与 POPGENE 的分析结果基本一致, 由表 4 可看出, 显著的遗传分化 (P = 0.010) 于种群内部和种群间均存在, 遗传变异在种群间占总遗传变异的 10.62%, 在种群内占 89.53%。

2.3　鸟巢蕨种群间的遗传距离与相似系数　从表 5可知, 鸟巢蕨 6 个种群的平均遗传相似度为 0.922 4,

表 4　鸟巢蕨自然种群遗传变异的 AMOVA 分析

Tab. 4　Analysis of molecular variance (AMOVA) of natural populations of *Asplenium nidus*

变异来源 Source of variance	自由度 *df*	平方和 *SS*	均方 *MS*	变异大小 Variancecomponents	变异百分率/% Percentageof variation	概率 *P*
种群间	5	471.146	94.229	3.959	10.62%	0.010
种群内	90	2 997.989	33.311	33.311	89.53%	0.010
总计	95	3 469.135		37.270	100%	

表 5　基于 SRAP 6 个鸟巢蕨种群间的遗传相似度和遗传距离

Tab. 5　Genetic similarity and genetic distance among the 6 populations of *Asplenium nidus* based on SRAP

种群 Population	BW	EXL	LMS1	LMS2	LMS3	WZS
BW	****	0.950 5	0.925 6	0.926 9	0.897 7	0.923 7
EXL	0.050 8	****	0.942 1	0.929 5	0.911 5	0.934 5
LMS1	0.077 3	0.059 7	****	0.915 0	0.937 6	0.928 9
LMS2	0.076 0	0.073 1	0.088 8	****	0.889 9	0.897 6
LMS3	0.107 9	0.092 7	0.064 4	0.116 6	****	0.925 5
WZS	0.079 4	0.067 7	0.073 8	0.108 0	0.077 4	****

注: 种群同表1一致。上部为遗传相似度, 下部为遗传距离。

Note: The population is consistent with Table 1. The upper part is genetic similarity and the lower part is genetic distance.

平均遗传距离为 0.080 9。其中，BW 和 EXL 的遗传距离最近，为 0.050 8，LMS2 和 LMS3 遗传距离最远，为 0.116 6。

SRAP 标记对 6 个种群鸟巢蕨野外种群遗传距离的 UPGMA 聚类分析结果表明，海南岛 6 个鸟巢蕨种群可分为三大类：由图 3 可得，地理位置较近的 BW 和 EXL 为第 I 类；同一地区的 LMS1 和 LMS3 聚类在了一起为第 II 类；而 LMS2 与其余种群为第 Ⅲ 类，其遗传距离最大，遗传分化也最显著。

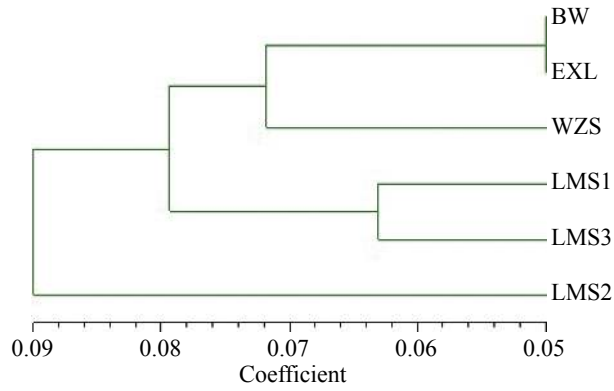

图 3 海南岛鸟巢蕨 6 个种群 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类图

Fig. 3 Dendrogram of the six natural populations of *Asplenium nidus* in Hainan Island based on Nei 's makers using UPGMA cluster analysis

3 讨 论

3.1 鸟巢蕨自然种群遗传多样性 遗传多样性是生物多样性重要组成部分，是生态系统多样性和物种多样性的基础[16－17]，也是分析物种进化潜力和未来命运重要方向[18]。遗传多样性大小是物种长期进化的产物，是其生存适应和发展进化的前提[20]。遗传多样性越高的物种对环境变化适应能力就越强，越容易在其分布范围内扩展和开拓新生境[20－21]。

本研究结果表明，海南岛野生鸟巢蕨种群具有较高遗传多样性，多态位点百分比 (PPB) 在 76.09% (LMS2 种群) ~ 94.57%(LMS3 种群) 之间，平均为 85.15%。该结果与潘丽芹等[22] 的荷叶铁线蕨自然居群的遗传多样性研究和董元火等[23] 的水蕨的生境及其遗传多样性分析结果相似，但与黄庆阳等[24] 对香鳞毛蕨种质资源遗传多样性的 AFLP 分析研究结果存在一定差异。原因可能是研究材料地理分布差异较大，或使用的分子标记技术不同所导致。本研究中，野生鸟巢蕨种群间生境差异不大，但随着海拔增加，气候、土壤、植被等也随之发生了明显变化，因而造成 6 个种群较高遗传多样性。其中，LMS3 地区遗传多样性最高（*Ne*、*He*、*Ho* 分别为 1.533 2、0.322 5、0.488 1），可能黎母山（LMS）作为海南三大江河（南渡江、万泉河、昌化江）的发源地，石灰岩沟谷较多，符合鸟巢蕨对生境要求。加上黎母山林区属热带季风气候，季风带来长期潮湿更有利于鸟巢蕨孢子传播和更新，而霸王岭样地鸟巢蕨种群遗传多样性最小（*Ne*、*He*、*Ho* 分别为 1.479 9、0.282 2、0.422 7）；有两个方面的原因：一是所采集个体的海拔分布较低，受人为干扰较重；另一原因可能是鸟巢蕨分布地受季风影响较小，不利于孢子传播和附着。本研究结果表明，在海南岛 6 个鸟巢蕨种群中 LMS3 鸟巢蕨种群内部遗传变异最多，而 BWL 鸟巢蕨种群内部遗传变异则相对较少。

3.2 种群的遗传变异和遗传结构 遗传结构指种群中遗传变异分布的时空格局，其在基因流、基因突变和自然选择的共同作用下形成，也与物种进化史和生物学特性有关[25－26]。

鸟巢蕨虽然在种群和物种水平均具有较高的遗传多样性，但相比较而言，种群水平遗传多样性要低于物种水平，与种群间具有较高基因流（*Nm*=1.664 2，*Nm*>1）有关，使漂变成为划分种群遗传结构主导因素，表明鸟巢蕨距离较远种群间也存在一定程度基因交流[27－28]。遗传分化程度 *Gst* 为 0.130 6，在 0.05 ~ 0.15 之间，属于中等程度遗传分化。

基于 SRAP 标记得出 6 个鸟巢蕨野生种群多态位点百分率、Shannon 信息指数 (*Ho*)、Nei's 基因多样性 (*He*)、种群内遗传多样性指数和总遗传多样性指数，通过 AMOVA 分析结果显示总的种群间变异为 11%，说明鸟巢蕨种群内存在丰富的遗传变异，6 个鸟巢蕨野生分布种群间均有较高遗传变异，黎母山种群与其他 5 个种群遗传变异最明显。蒋速飞等 [29] 发现，丰富的遗传变异可能是物种具有较高遗传多样性的原因之一 。由于鸟巢蕨是孢子繁殖，孢子不易于长距离迁徙，易造成地理隔离，推测地理隔离可能是造成鸟巢蕨种群间遗传分化较大原因，而较高遗传变异可能是本研究中各鸟巢蕨种群间遗传多样性较高的原因之一[30]。

3.3 鸟巢蕨自然种群保护 物种遗传多样性水平能反映其适应能力和进化潜力，还有助于物种稀有或

濒危原因及过程的探讨[31]。对珍稀濒危物种保护方针和措施的制定，如采样策略迁地或就地保护选样等都有赖于人们对物种遗传多样性认识[32－33]。鸟巢蕨靠孢子繁殖，而孢子适宜在潮湿的环境生长，海南岛气候十分适宜鸟巢蕨繁殖生长，本研究也证实海南岛鸟巢蕨具较高遗传多样性，说明在本研究所选区域现阶段人为活动对鸟巢蕨的数量和遗传多样性影响较小，各区域还有一定数量鸟巢蕨种群分布。

值得注意的是，一旦生境遭到破坏会直接导致孢子不能传播和存活，鸟巢蕨原生基因就会丧失，其遗传多样性也会随之降低。建议鸟巢蕨保护应以就地保护为主，可选择鸟巢蕨种群遗传多样性较高的黎母山保护区区域（如本研究的黎母山 LMS3 区域）建立级别更高的自然保护区，加大保护和自然恢复力度，扩大保护边界。针对鸟巢蕨孢子不易于长距离迁徙导致不同种群之间遗传分化较大这一现象，可对不同自然群体中鸟巢蕨个体迁地保护，结合采用重引入技术进行自然居群恢复，提高种群竞争力和多样性，扩大群体间基因交流，最大限度保障鸟巢蕨遗传多样性，促进热带雨林国家公园建成。

参考文献:

[1] 董仕勇. 海南岛蕨类植物的分类、区系地理与保育[D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2004.
[2] 徐诗涛. 海南热带山地沟谷雨林鸟巢蕨附生特性研究[D]. 海口: 海南大学, 2013.
[3] FREIBERG M, TURTUN S M. Importance of drought on the distribution of the birds nest fern, *Asplenium nidus*, in the canopy of a lowland tropical rainforest in north-eastern Australia [J]. Austral Ecol., 2007, 32: 70－76.
[4] 林增顺, 刘冠明, 徐庆国. 利用 SRAP 标记分析水稻新品系遗传多样性[J]. 南宁: 基因组学与应用生物学, 2019, 38(4): 1683－1688.
[5] MUKESH K, VEENA C, UIJWAL S, et al. Application of molecular markers and their utility in genetic studies of floricultural crops: A review [J]. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, 2019, 12(3): 229－247.
[6] 杨梦婷, 黄洲, 干建平, 等. SSR 分子标记的研究进展[J]. 杭州: 杭州师范大学学报 (自然科学版), 2019, 18(04): 429－436.
[7] 彭亮. 丹参种质资源及其遗传多样性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
[8] 杨金华. SRAP 标记在植物研究中的应用[J]. 种子科技, 2019, 37(7): 55.
[9] 孟慧, 陈波, 杨云. SRAP 技术分析海南降香檀遗传多样性[J]. 热带农业科学, 2018, 38(12): 37－42.
[10] 王锦楠, 陈进福, 陈武生, 等. 柴达木地区野生黑果枸杞种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物生态学报, 2015, 39(10): 1003－1011.
[11] 徐诗涛, 陈秋波, 宋希强, 等. 新型蔬菜鸟巢蕨嫩叶成分检测[J]. 热带作物学报, 2012, 33(8): 1487－1493.
[12] 徐诗涛, 钟云芳, 陈秋波, 等. 鸟巢蕨资源利用与评价[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(27): 13446－13448.
[13] 杨光穗, 尹俊梅, 徐世松, 等. 海南蕨类植物资源及其开发利用[J]. 海南师范大学学报, 2007(1): 69－74.
[14] 徐诗涛. 雨林空中花园植物—鸟巢蕨[M]. 北京: 科学出版社, 2018.
[15] LI G C, QUIROS F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455－461.
[16] 董琳. 基于 SSR 和 ISSR 梁子湖野生菰种质资源遗传多样性研究[D]. 南昌: 江西财经大学, 2018.
[17] 解新明, 云锦凤. 植物遗传多样性及其检测方法[J]. 中国草地, 2000(6): 52－60.
[18] 王琳. 基于 ISSR 的连翘遗传多样性研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2015.
[19] 沈浩, 刘登义. 遗传多样性概述[J]. 生物学杂志, 2001(3): 5－7.
[20] 王东娜, 牟长城, 高卓, 等. 胡桃楸天然种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 经济林研究, 2011, 29(2): 22－29.
[21] 江焕. 海南岛金钟藤快速扩张的遗传基础及群落特征研究[D]. 海口: 海南大学, 2019.
[22] 潘丽芹, 季华, 陈龙清. 荷叶铁线蕨自然居群的遗传多样性研究[J]. 生物多样性, 2005(2): 122－129.
[23] 董元火, 王青锋. 水蕨的生境及其遗传多样性分析[J]. 武汉大学学报 (理学版), 2007(2): 224－230.
[24] 黄庆阳, 樊锐锋, 常缨. 香鳞毛蕨种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中草药, 2010, 41(6): 971－974.
[25] 李文斌, 魏胜利, 罗琳, 等. 甘草种质主要形态性状和化学成分的遗传多样性分析[J]. 中草药, 2019, 50(2): 517－525.
[26] 彭幼红. 青藏高原东缘青杨 (*Populus cathayana* Rehd.) 遗传多样性研究[D]. 成都: 中国科学院研究生院 (成都生物研究所), 2006.
[27] 黄勇. 基于 SRAP 分子标记的小果油茶遗传多样性分析[J]. 北京: 林业科学, 2013, 49(3): 43－50.
[28] 尹淑英. 紫花苜蓿的种子功能性状及 SSR 分子标记的遗传多样性[D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
[29] 武德功, 杜军利, 贺春贵, 等. 绿色豌豆蚜不同地理种群的遗传多样性[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23(4): 465－472.
[30] 邢婀娜, 徐诗涛, 任明迅. 海南特有毛花马铃苣苔小尺度局域种群的年龄结构与基因流[J]. 热带生物学报, 2018, 9(1): 37－46.
[31] 陈珊珊, 周明芹. 浅析遗传多样性的研究方法[J]. 长江大学学报 (自然科学版) 农学卷, 2010, 7(3): 54－57.
[32] 田骏. 种质资源遗传多样性研究进展[J]. 草业与畜牧, 2012(10): 53－58.
[33] 徐海燕. 中国柏木属 (*Cupressus* L.) 四个物种的遗传多样性研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.

Analysis of Population Genetic Diversity of Wild *Asplenium nidus* in Hainan Island Based on SRAP Markers

HOU Xiangwen[1,3], XU Shitao[2], WANG Deli[3], LIANG Jingwen[2], SI Genghua[2]
(1. School of Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Horticulture College, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;
3. Hainan Branch, Institute of medicinal plants, Chinese Academy of Medical Sciences, Haikou, Hainan 570311, China)

Abstract: *Asplenium nidus*, commonly called bird's nest fern, now unique in the rainforest, is referred to as a "Hanging Garden" plant. In order to reveal the genetic diversity and genetic relationship of the natural population of *A. nidus*, and promote the effective conservation and utilization of wild *A. nidus* resources, 96 samples were collected from 6 populations of *A. nidus* in Hainan Island, and clustered by using UPGMA cluster analysis based on SRAP markers. The results showed that a total of 184 loci were amplified by 10 pairs of primers in *A. nidus*, of which 174 were polymorphic loci with the percentage of polymorphic loci or bands (PPB) being 94.57%. The PPB varied greatly in the populations, with an average of 85.15% based on SRAP markers. The populations of *A. nidus* had a relatively higher genetic variation, and each population had a high level of genetic diversity. POPGENE analysis showed that the percentage of genetic differentiation within the population was 86.94%, while the percentage of genetic differentiation between populations was 13.06%, which proved that there was a certain level of genetic differentiation among the populations. The average genetic similarity of the 6 populations of *A nidus* was 0.9224, and the average genetic distance was 0.0809. The genetic distance of the populations between BW and EXL was the closest, which was 0.0508, and the genetic distance between LMS2 and LMS3 was the longest, which was 0.1166. UPGMA cluster analysis showed the genetic distance of the wild populations of *A. nidus* in BW and EXL are geographically close, and hence were clustered together, indicating that the gene flow of *A nidus* in these two locations was smooth. The *A nidus* populations in LMS1 and LMS3 in the same area were clustered together. The genetic distance between the population in LMS2 and other populations in LiMushan area was the highest, and the genetic differentiation was also the most significant. This shows that SRAP markers have abundant polymorphisms among the populations of *A nidus* and are of great significance for revealing the genetic relationship of *A nidus*. When compared with the wild habitat, the population of *A. nidus* in each area was found to be damaged to different degrees. It is recommended to focus on *in-situ* conservation of *A nidus*. The LMS3 area, where the genetic diversity of the *A nidus* population is higher, can be selected to establish a higher-level nature reserve or Hainan tropical rainforest national park to facilitate expansion and rehabilitation of the population and habitat of *A nidus* for conservation of tropical rainforest and sustainable development of plant diversity.

Keywords: Hainan Island; *Asplenium nidus*; SRAP; genetic diversity; cluster analysis

(责任编辑:潘学峰)