

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.10001

赵字陈, 赵玉娟, 龚洵, 潘跃芝. 龙血树柴胡的遗传多样性及其分布特征研究[J]. 植物科学学报, 2022, 40(1): 1-10

Zhao ZC, Zhao YJ, Gong X, Pan YZ. Study on genetic diversity and distribution patterns of *Bupleurum dracaenoides* Huan C. Wang, Z. R. He & H. Sun[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(1): 1-10

龙血树柴胡的遗传多样性及其分布特征研究

赵字陈^{1,2}, 赵玉娟¹, 龚洵¹, 潘跃芝^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 云南省野生资源植物研发重点实验室, 昆明 650201; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 本研究基于 7 个叶绿体 DNA 片段(cpDNA)和 2 个核 DNA 片段(ITS 和 *PZ8*)的测序数据, 对龙血树柴胡(*Bupleurum dracaenoides* Huan C. Wang, Z. R. He & H. Sun)8 个居群的 153 个样本进行了遗传多样性和分布式样研究。cpDNA 片段分析结果显示: 龙血树柴胡在物种水平具有较高的遗传多样性($H_d = 0.862$; $P_i = 0.00567$), 但居群内遗传多样性低, 遗传变异主要存在于居群间, 遗传分化显著($F_{st} = 0.959$); 而核 DNA 片段 ITS 和 *PZ8* 的数据分析结果显示, 其遗传多样性较低($H_d = 0.532$, $P_i = 0.00121$ 和 $H_d = 0.349$, $P_i = 0.00060$), 遗传变异主要存在于居群内, 居群间仅存在一定程度的遗传分化。中性检验和失配分布分析结果发现龙血树柴胡没有经历过近期种群扩张事件, 8 个居群的 153 个样本从遗传成份上可被分为两组。研究结果将为龙血树柴胡的资源保护和发掘提供参考。

关键词: 龙血树柴胡; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)01-0001-10

Study on genetic diversity and distribution patterns of *Bupleurum dracaenoides* Huan C. Wang, Z. R. He & H. Sun

Zhao Zi-Chen^{1,2}, Zhao Yu-Juan¹, Gong Xun¹, Pan Yue-Zhi^{1*}

(1. Yunnan Key Laboratory for Wild Plant Resources, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; 2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: *Bupleurum dracaenoides* Huan C. Wang, Z. R. He & H. Sun is a recently published species characterized by a woody stem up to 1.5 m in height. It is the only woody species of the genus *Bupleurum* found in Asia and is endemic to the dry-hot valleys of the Jinsha River. The distribution of *B. dracaenoides* is quite narrow, with only a few populations found in the Pudu River area of Yunnan Province and Huidong County of Sichuan Province. It is a critically endangered species, with a limited number of individuals and threatened wild habitat. Thus, assessing its genetic diversity and distribution patterns is urgent for the protection of its wild resources. In this study, 153 individuals were studied using seven chloroplast DNA fragments and two nuclear DNA fragments to investigate the genetic diversity and distribution within and among eight populations of *B. dracaenoides*. Based on chloroplast DNA data analysis, *B. dracaenoides* showed high genetic diversity at the species level ($H_d = 0.862$; $P_i = 0.00567$), and genetic variations were mostly distributed among populations ($F_{st} = 0.959$). However, genetic diversity at the species level was relatively low based on ITS and *PZ8* (ITS: $H_d = 0.532$, $P_i = 0.00121$; *PZ8*: $H_d = 0.349$, $P_i = 0.00060$), and genetic variations were mostly

收稿日期: 2021-06-16, 修回日期: 2021-08-21。

基金项目: 科技部国家重点研发计划(2017YFC0505204)。

This work was supported by a grant from the National Key Research and Development Program of China(2017YFC0505204)。

作者简介: 赵字陈(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物种质资源评价(E-mail: 1757199708@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: panyuezhi@mail.kib.ac.cn)。

distributed within populations (ITS: F_{st} = 0.475; $PZ8$: F_{st} = 0.093). Neutral test and mismatch distribution analyses of the chloroplast DNA, ITS, and $PZ8$ data indicated that *B. dracaenoides* has not experienced recent population expansion. STRUCTURE analysis of the combined nuclear DNA sequencing data revealed that all 153 individuals were grouped into two genetic clusters.

Key words: *Bupleurum dracaenoides*; Genetic diversity; Genetic structure

金沙江河谷独特的地形和气候使得很多热带植物和一些古老孑遗物种在此得以保存, 并演化出一些适应干热环境的特有种类^[1, 2], 龙血树柴胡(*Bupleurum dracaenoides* Huan C. Wang, Z. R. He & H. Sun) 为其中之一。该物种发表于 2013 年, 为伞形科柴胡属木本植物, 是迄今为止发现的亚洲唯一的柴胡属木本植物。其生长在海拔 2500 m 左右的陡峭山崖石壁缝隙中, 为金沙江河谷特有^[3]。龙血树柴胡分布范围十分狭窄, 仅在四川的会东县和云南的普渡河流域有分布, 各居群分布点在地理位置上亦是较为接近。龙血树柴胡作为一个新近发现、发表的极危种, 种群数量少, 分布区域狭窄, 其基本生物学特性如繁殖特性及染色体倍性等方面的研究还是空白, 遗传多样性评价也仅见于王馨蕊^[4]利用 5 对微卫星标记 (SSR) 对其进行的初步评价。由于人们缺乏对龙血树柴胡生物学特性以及生存状况和利用价值的深入研究和认识而未对其采取应有的保护。在 2018 – 2019 连续两年的野外调查和材料采集过程中, 我们共发现龙血树柴胡 300 余株, 但每年仅观察到一株或两株开花结果, 即龙血树柴胡在野外的开花结实率非常低, 小实生苗极少发现。因此, 龙血树柴胡现存个体数量稀少, 野外资源更新缓慢, 急需保护。

对特有或濒危植物遗传多样性的了解, 将有助于对其制定合理的保护及管理策略^[1], 如保护单元的制定^[5]。王馨蕊^[4]利用 5 对 SSR 分子标记的研究发现, 龙血树柴胡遗传多样性偏低, 遗传分化小。近年来, 测序技术快速发展并广泛应用于植物遗传多样性研究中, 本文在之前测序、组装 6 个龙血树柴胡样本叶绿体基因组的基础上, 开发具有多态性位点的叶绿体 DNA (cpDNA) 片段标记, 并通过文献查找、筛选合适的核 DNA (nDNA) 片段标记, 基于两类 DNA 片段标记分析评价龙血树柴胡的遗传多样性及其分布, 以便为制定有效的保护策略和措施提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

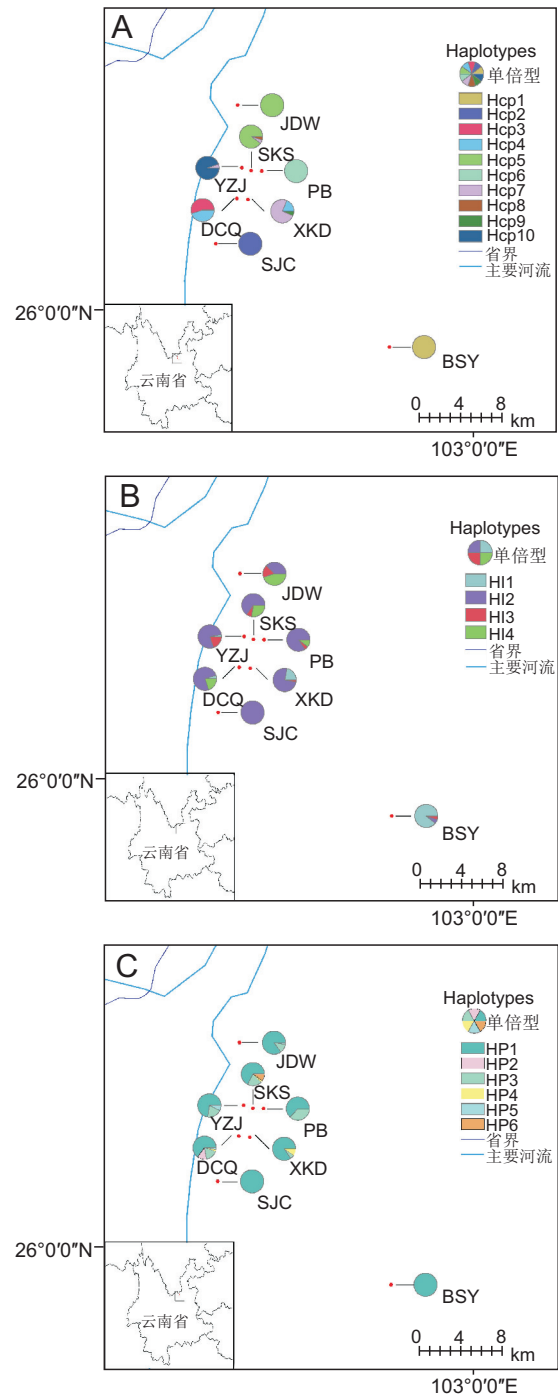
本研究所用的材料采自云南省北部金沙江流域的禄劝县和寻甸县 (表 1, 图 1)。新鲜叶片采集后用硅胶干燥, 带回实验室备用。参考该种的分布信息^[3, 4], 本研究共采集到 8 个居群的 153 个样本。在采集过程中, 如果 1 个居群的植株个体数超过 20 株, 每隔 10 m 采集 1 个样本, 共采集 20 株; 如果 1 个居群内个体数不足 20, 则全部采集。

表 1 龙血树柴胡 8 个居群的采样信息
Table 1 Sampling information on eight populations of *Bupleurum dracaenoides*

| 编号 ID | 采样地点 Sampling site | 经纬度 Latitude and longitude | 海拔 / m Altitude | 个体数 Individuals |
|----------|-----------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| JDW | 禄劝县九道弯 | 26.179°N, 102.794°E | 2623.0 | 20 |
| YZJ | 禄劝县岩子角 | 26.124°N, 102.797°E | 2646.0 | 20 |
| SKS | 禄劝县三棵树 | 26.121°N, 102.801°E | 2570.0 | 20 |
| PB | 禄劝县瀑布 | 26.121°N, 102.806°E | 2573.0 | 19 |
| DCQ | 禄劝县打超箐 | 26.097°N, 102.793°E | 2590.0 | 20 |
| XKD | 禄劝县新棵达 | 26.096°N, 102.793°E | 2592.0 | 16 |
| SJC | 禄劝县三家村 | 26.058°N, 102.775°E | 2548.1 | 20 |
| BSY | 寻甸县白石岩箐 | 25.967°N, 102.926°E | 2389.0 | 18 |

1.2 DNA 提取和测序

采用改良的 CTAB 法^[6]进行叶片材料的 DNA 提取。从 3 个地理位置相对较远的居群 (JDW、SKS 和 BSY) 中各选两个样本的总 DNA, 经 Illumina HiSeq 进行浅层基因组测序, 并组装 6 个样本的叶绿体基因组^[7]。通过 Geneious Prime 软件对 6 个龙血树柴胡叶绿体基因组数据进行详细比对, 筛选并提取出变异位点丰富且序列长度适中 (600 ~ 1000 bp) 的片段, 最终选出 7 个扩增和测序成功率高且变异位点丰富的 cpDNA 片段用于本研究 (表 2)。依据引物的通用性、特异性和多态性的特点, 经筛选, 最终选择常用的 ITS 以及 $PZ8$ ^[8]用于龙血树柴胡遗传多样性研究。对 153 个龙血树柴胡样本进行 9 个分子标记的 PCR 扩增, 扩增产物



A: cpDNA; B: ITS; C: PZ8.
图 1 龙血树柴胡各单倍型在 8 个居群中的分布情况
Fig. 1 Haplotype distribution in eight populations of *Bupleurum dracaenoides*

用于双端测序。
1.3 数据分析

测序原始序列利用 DNASTar 软件中的 SEQ-MAN v7.1^[9] 进行校对，使用 BioEdit v7.0 软件^[10] 中的 Clustal W 进行多序列比对。利用 PAUP v4.0

软件^[11] 将 7 个叶绿体片段序列进行联合。对于 nDNA 片段 ITS 和 PZ8，使用 DnaSP v5.1 软件^[12] 中的 PHASE 功能进行序列的拆分。

利用 DnaSP v5.1 软件分别分析 cpDNA、ITS 和 PZ8 序列的单倍型数目和变异位点特征，计算总体和各居群的核苷酸多样性 (P_i)、单倍型多样性 (H_d)，统计各单倍型在不同居群中的分布情况。利用该软件分别基于 cpDNA、ITS 和 PZ8 数据计算 Tajima's D ^[13]、Fu and Li's s ^[14] 等中性检验值，并在群体扩展模型下进行失配分布 (Mismatch distributions) 分析。利用 Arlequin v3.5^[15] 软件进行居群的 SSD 值以及糙度指数 r 值计算。如果 Tajima's D 显著小于 0，则表示种群经历了扩张或者受到了定向选择；而如果 Tajima's D 显著大于 0，表明种群经历了收缩或受到了平衡选择^[13]。依据 Fu and Li's 值检验中性进化的方法在检测中引入了外类群，是比 Tajima's D 更敏感的中性检验^[16]。而失配分析依据的是模型假设，是基于单倍型两两之间观察到的碱基差异数目的分布来推测种群大小是否发生过变化，在动态平衡下，失配分布图表现出双峰或者多峰分布；若种群经历过扩张，失配分布图表现为单峰分布 (泊松分布)^[17]。

基于各居群 cpDNA、ITS 和 PZ8 序列的单倍型数据，利用 Arlequin v3.5 软件中的分子差异性方差分析 (Analysis of molecular variance, AMOVA)，对遗传变异在居群内部和居群之间的分布进行评估，1000 次置换，得到固定系数 F_{st} ，依据 Wright^[18] 的标准判断居群间的分化程度。通过公式 $Nm = (1 - F_{st}) / 4 \times F_{st}$ 估算居群之间的核基因流 (Nm)^[19]。利用 Permut v1.0^[20] 统计居群分化系数 G_{st} ，并通过公式 $Nm = (1 - G_{st}) / G_{st}$ 估算居群之间的叶绿体基因流^[19]。

利用 STRUCTURE v2.3^[21] 软件基于两个核片段 (ITS 和 PZ8) 的序列联合矩阵进行聚类分析，解析 8 个居群的分组和各组间基因交流的情况。Length of burn-in-period 和 MCMC 重复抽样次数均设置为 100 000，聚类分组 K 值为 1~8，每个 K 值进行 10 次独立的运算；利用在线软件 Structure Harvester v0.6^[22] 获得连续 K 值之间 $\ln P(D)$ 的变化率 (ΔK) 折线图，选择最佳 K 值。

利用网站 Network10.2 (<http://www.fluxus-engineering.com>) 的 MJ (Median-joining network)

表 2 cpDNA 和 nDNA 标记的引物信息
Table 2 Information on primers of cpDNA and nDNA markers

| 引物 Primer | | 引物序列 Primer sequence (5' – 3') | 片段大小 Size / bp | 退火温度 Tm / °C |
|--------------|---|---|-------------------|-----------------|
| cpDNA | <i>trnK</i> ^(UUU) - <i>rps16</i> | F: TGTCAAATGATAGACCACCTCT R: TAGTTCCTCAATCGGGCGG | 431 | 57.5 |
| | <i>atpH-atpI</i> | F: CGCTACAATTCATCCAGGCG R: TCCCAAGGCCACGTATGC | 629 | 57.0 |
| | <i>psbM-trnD</i> ^(GUC) | F: TCGTCGTCGAGAATTGAATAGT R: CTTTTCTGTCAACAGGGGAGC | 412 | 57.5 |
| | <i>ycf3-trnS</i> ^(GGA) | F: CTCTCGCGGTAACCGATCC R: CCGAGTGAATAGCGAGCCTT | 729 | 57.0 |
| | <i>ndhC-trnV</i> ^(UAC) | F: TTAGTCGACGCGACTTGAAATTG R: AAGTGAAATCCTGACGTGAGTCC | 705 | 57.0 |
| | <i>atpB-rbcL</i> | F: AGCACGTGATTTCGTTGGTA R: ACTCGACATGAATTAGGCGTT | 565 | 56.5 |
| | <i>ndhF-rpB2</i> | F: TGGGCAACTGATATGACCAACT R: TGCTGTTCTTTATGATTACATCCA | 691 | 58.0 |
| nDNA | ITS | ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC ITS5: GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG | 664 | 52.0 |
| | <i>PZ8</i> | F: GGGAAGGAAAAGTTGCTCT R: TATTCGTGTTGGGCATCTG | 645 | 52.0 |

算法分析 cpDNA、ITS 和 *PZ8* 单倍型网状分支关系和共祖模拟。分析时，将各片段中的 Indel 视为单碱基突变事件。该分析基于最大简约法进行，稀有单倍型通常位于分支末端，广泛分布的单倍型通常位于聚类簇内部，可能为祖先单倍型或较原始的单倍型。

2 结果与分析

2.1 龙血树柴胡的遗传多样性

本研究发现，在龙血树柴胡 8 个居群的 153 个样本中，7 个 cpDNA 片段联合后测定总长度为 4138~4160 bp，经比对后的矩阵一致长度为 4162 bp，共检测到 83 个变异位点，其中 76 个为单核苷酸多态位点 (SNPs)，7 个为插入缺失位点 (Indels) (1~12 bp)。8 个居群的 cpDNA 序列共检测到 10 种单倍型 (表 3)，其中，Hcp7 分布最广，分布于 SKS、XKD、YZJ 3 个居群中；其次是 Hcp4、Hcp5，均在两个居群中出现，其他单倍型均仅在单个居群中出现。各单倍型中，出现频率最高的是 Hcp5，出现在居群 JDW 和 SKS 的 38 个样本中；出现频率最低的是 Hcp8 和 Hcp9，均仅出现在 1 个样本中。从居群水平看，BSY、SJC、JDW、PB 居群均仅含 1 种单倍型，居群内遗传多样性为 0，其中 BSY、SJC、PB 所含的单倍型均

为特有单倍型 (图 1: A，表 3)。在物种水平上，cpDNA 的单倍型多样性 (H_d) 为 0.862，核苷酸多样性 (P_i) 为 0.00567。

比对后的 ITS 序列长度为 664 bp，在 8 个居群中共检测到 3 个变异位点，均为 SNPs，生成 4 种单倍型。单倍型 HI2 分布最广且频率最高，在 8 个居群中均有分布；其余单倍型均在 4~5 个居群中出现。在居群水平上，SJC 居群仅含 1 种单倍型 HI2，居群内无变异；其余居群均或高或低的表现出了一定的遗传多样性 (图 1: B，表 3)。在物种水平上，ITS 序列的 H_d 为 0.532， P_i 为 0.00121。

比对后的 *PZ8* 序列长度为 645 bp，8 个居群共 5 个变异位点，均为 SNPs，得到 6 种单倍型。单倍型 HP1 分布最为广泛，在 8 个居群中均有分布，且频率最高；单倍型 HP5 和 HP6 仅分布在 1 个居群中。在居群水平上，居群 BSY、SJC 仅含 1 个单倍型，居群内无变异 (图 1: C，表 3)。在物种水平上，*PZ8* 序列的 H_d 为 0.349， P_i 为 0.0006。

因此，物种水平 cpDNA 的单倍型多样性和核苷酸多样性比 ITS 和 *PZ8* 均要高。在居群水平上，DCQ、SKS、XKD 的 cpDNA、ITS 和 *PZ8* 均有较高遗传多样性；居群 JDW、PB、YZJ 的 ITS 和 *PZ8* 两个核 DNA 片段有较高遗传多样性；SJC 居群的 cpDNA、ITS 和 *PZ8* 3 个片段均不存在遗传变异。

表 3 龙血树柴胡各居群的遗传多样性参数
Table 3 Values of genetic diversity index of eight populations of *Bupleurum dracaenoides*

| 居群号 Pop ID | cpDNA 单倍型 cpDNA haplotype (No.) | cpDNA 核苷酸多态性 cpDNA nucleotide diversity (π) | cpDNA 单倍型多态性 cpDNA haplotype diversity (H_d) | ITS 单倍型组成 ITS haplotype (No.) |
|---------------|---------------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| BSY | Hcp1(18) | 0 | 0 | HI1(32) HI2(2) HI3(2) |
| DCQ | Hcp3(11) Hcp4(9) | 0.13×10^{-3} | 0.521 | HI1(2) HI2(30) HI4(8) |
| JDW | Hcp5(20) | 0 | 0 | HI2(15) HI3(7) HI4(18) |
| PB | Hcp6(19) | 0 | 0 | HI2(32) HI3(2) HI4(4) |
| SKS | Hcp5(18) Hcp7(1) Hcp8(1) | 1.44×10^{-3} | 0.195 | HI2(26) HI3(3) HI4(11) |
| XKD | Hcp4(3) Hcp7(12) Hcp9(1) | 0.43×10^{-3} | 0.425 | HI1(7) HI2(24) HI3(1) |
| YZJ | Hcp7(1) Hcp10(19) | 0.10×10^{-3} | 0.100 | HI1(1) HI2(31) HI3(8) |
| SJC | Hcp2(20) | 0 | 0 | HI2(40) |
| Total | 10 | 5.67×10^{-3} | 0.862 | 4 |

| 居群号 Pop ID | ITS 核苷酸多态性 ITS nucleotide diversity (π) | ITS 单倍型多态性 ITS haplotype diversity (H_d) | PZ8 单倍型组成 PZ8 haplotype (No.) | PZ8 核苷酸多态性 PZ8 nucleotide diversity (π) | PZ8 单倍型多态性 PZ8 haplotype diversity (H_d) |
|---------------|---|--|--|---|--|
| BSY | 0.47×10^{-3} | 0.210 | HP1(36) | 0 | 0 |
| DCQ | 0.79×10^{-3} | 0.405 | HP1(26) HP2(5) HP3(7) HP4(1) HP5(1) | 0.96×10^{-3} | 0.544 |
| JDW | 1.21×10^{-3} | 0.642 | HP1(34) HP3(5) HP5(1) | 0.43×10^{-3} | 0.268 |
| PB | 0.45×10^{-3} | 0.284 | HP1(24) HP3(14) | 0.74×10^{-3} | 0.478 |
| SKS | 0.83×10^{-3} | 0.509 | HP1(27) HP3(8) HP4(1) HP6(4) | 1.03×10^{-3} | 0.506 |
| XKD | 1.11×10^{-3} | 0.401 | HP1(27) HP3(2) HP4(3) | 0.46×10^{-3} | 0.284 |
| YZJ | 0.61×10^{-3} | 0.368 | HP1(29) HP3(8) HP5(3) | 0.73×10^{-3} | 0.440 |
| SJC | 0 | 0 | HP1(40) | 0 | 0 |
| Total | 1.21×10^{-3} | 0.532 | 6 | 0.60×10^{-3} | 0.349 |

2.2 遗传结构

龙血树柴胡遗传变异分布特征的 AMOVA 分析结果显示(表 4)，基于 cpDNA 片段分析，龙血树柴胡的遗传变异主要存在于居群间；基于 ITS 和 PZ8 片段分析，则遗传变异大部分存在于居群内。 F_{st} 用于衡量居群的遗传分化水平，基于 cpDNA 数据计算得到的固定系数 F_{st} 为 0.959，基于 ITS 分析得到的 F_{st} 值为 0.475，基于 PZ8 分析得到的 F_{st} 值为 0.093。结果表明，基于 cpDNA、ITS 数据计算

得到的固定系数 F_{st} 均大于 0.25，说明龙血树柴胡居群间存在显著的遗传分化；而利用 PZ8 数据分析得到的 F_{st} 大于 0.05 但小于 0.15，说明龙血树柴胡居群间存在着中度的遗传分化。基于 F_{st} 值计算得到的 ITS 和 PZ8 基因流 Nm 值分别为 0.3219 和 2.4382。同时，Permut 分析得到的 cpDNA 的 G_{st} 值为 0.839，ITS 的 G_{st} 值为 0.610，PZ8 的 G_{st} 值为 0.098。基于 cpDNA 的 G_{st} 值计算得到的叶绿体基因流为 0.1919。

表 4 基于 cpDNA 和 nDNA 序列的 AMOVA 分析
结果及基因流
Table 4 AMOVA based on cpDNA, nDNA, and Nm

| 标记 Marker | 变异来源 Source of variation | df | 变异百分比 Percentage of variation / % | 分化系数 F_{st} | 基因流 Nm |
|--------------|--------------------------------|-----|---|------------------|-----------|
| cpDNA | 居群间 | 7 | 95.86 | 0.959 * | 0.1919 |
| | 居群内 | 145 | 4.14 | | |
| ITS | 居群间 | 7 | 47.50 | 0.475 * | 0.3219 |
| | 居群内 | 298 | 52.50 | | |
| PZ8 | 居群间 | 7 | 9.32 | 0.093 * | 2.4382 |
| | 居群内 | 298 | 90.68 | | |

基于两个 nDNA 片段(ITS 和 PZ8)联合数据的 STRUCTURE 聚类分析结果显示，所有居群的最优分组为 $K = 2$ ，其次为 $K = 4$ (图 2)。龙血树柴胡的 8 个居群的样本可被分为 2 组，即 BSY 居群单独为一组，其遗传成份相对独立和单一，其余 7 个居群聚为另一组。当 $K = 2$ 时，除 SJC 居群外，其余居群内的部分个体的遗传成份与 BSY 居群的遗传成份相似；当 $K = 3$ 和 4 时，居群 DCQ、XKD 和 YZJ 的部分个体遗传成份与居群 BSY 样本相似(图 2)。

Network 的单倍型网状分支关系如图 3 所示。一般来说，新衍生出的单倍型往往位于网状分支的

Note: *, $P < 0.001$.

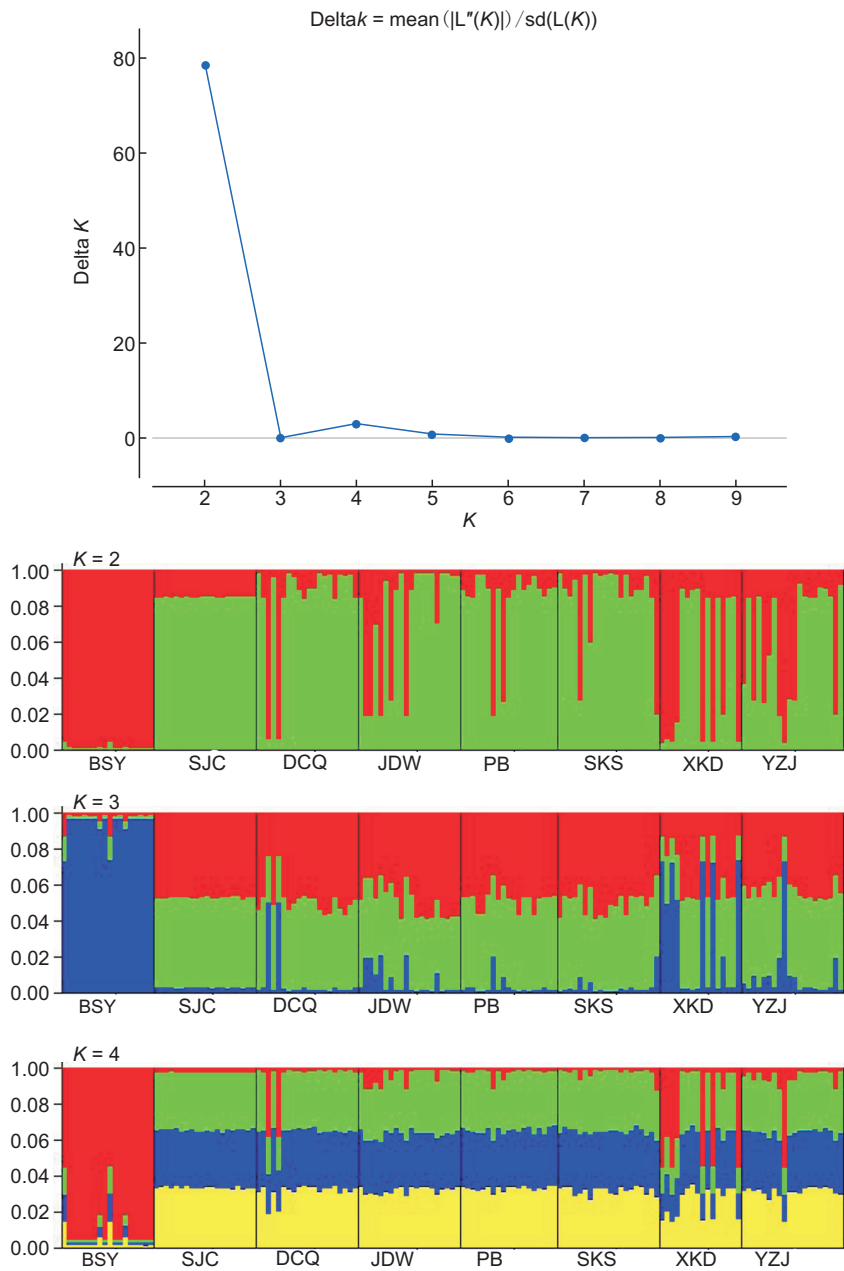


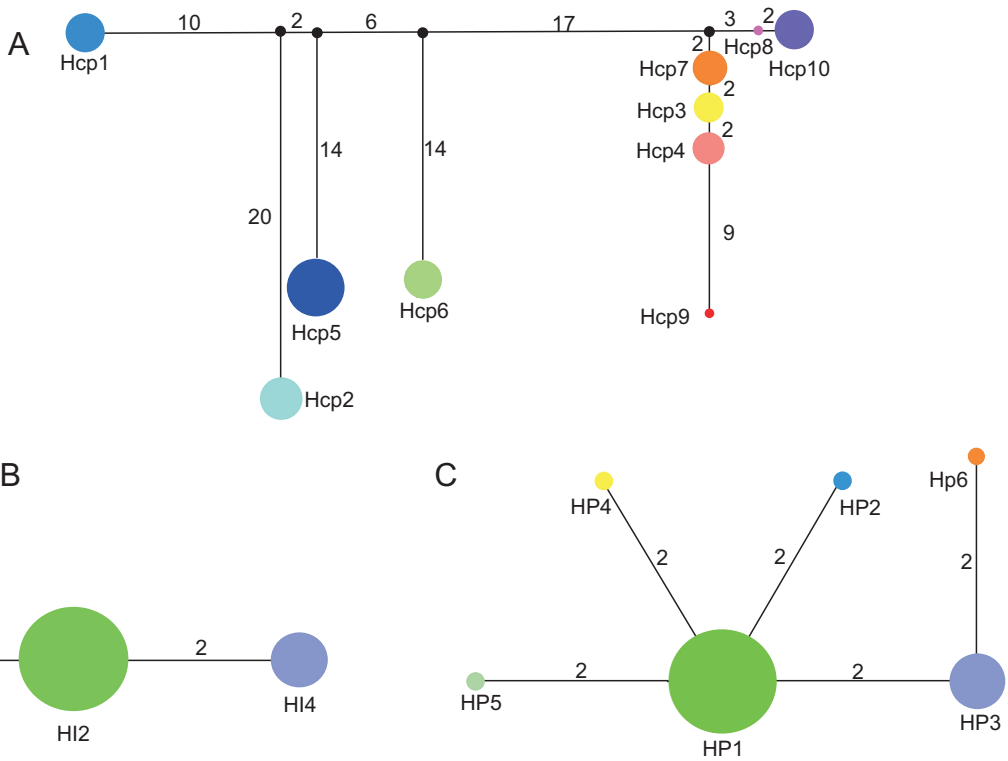
图 2 龙血树柴胡 8 个居群基于 nDNA 联合分析的 ΔK 折线图及 STRUCTURE 聚类结果 ($K=2, 3, 4$)
Fig. 2 ΔK distribution and STRUCTURE analysis ($K = 2, 3, 4$) based on combined nDNA data of eight populations of *Bupleurum dracaenoides*

外部节点位置，而祖先单倍型更容易处于内部结点位置。在 cpDNA 单倍型网状图中(图 3: A)，有多个假定丢失的单倍型，单倍型 Hcp5 频率最高，Hcp3、Hcp4、Hcp7、Hcp8、Hcp9、Hcp10 关系相对较近。在 ITS 单倍型网状图中，单倍型 HI2 频率最高，且位于内部结点位置，其可能是祖先单倍型(图 3: B)。在 PZ8 单倍型网状图中，各单倍型关系呈现为星状分布，其中 HP1 频率较高，且位于内部结点位置，可能为祖先单倍型

(图 3: C)。

2.3 种群动态

基于 cpDNA 片段标记分析的 Tajima's D (2.282)和 Fu and Li's F (2.628)均为显著正值 ($P < 0.05$)，SSD 值(0.035)和 r 值(0.048)同样为显著正值 ($P < 0.01$)，表明龙血树柴胡在历史上可能经历过种群收缩。在种群扩张模型下，基于 cpDNA 数据分析获得的失配分布曲线为多峰(图 4)，观测值背离了期望值，表明龙血树柴胡没有



A: cpDNA; B: ITS; C: *PZ8*.

图 3 各单倍型的进化关系
Fig. 3 Evolutionary relationships of haplotypes

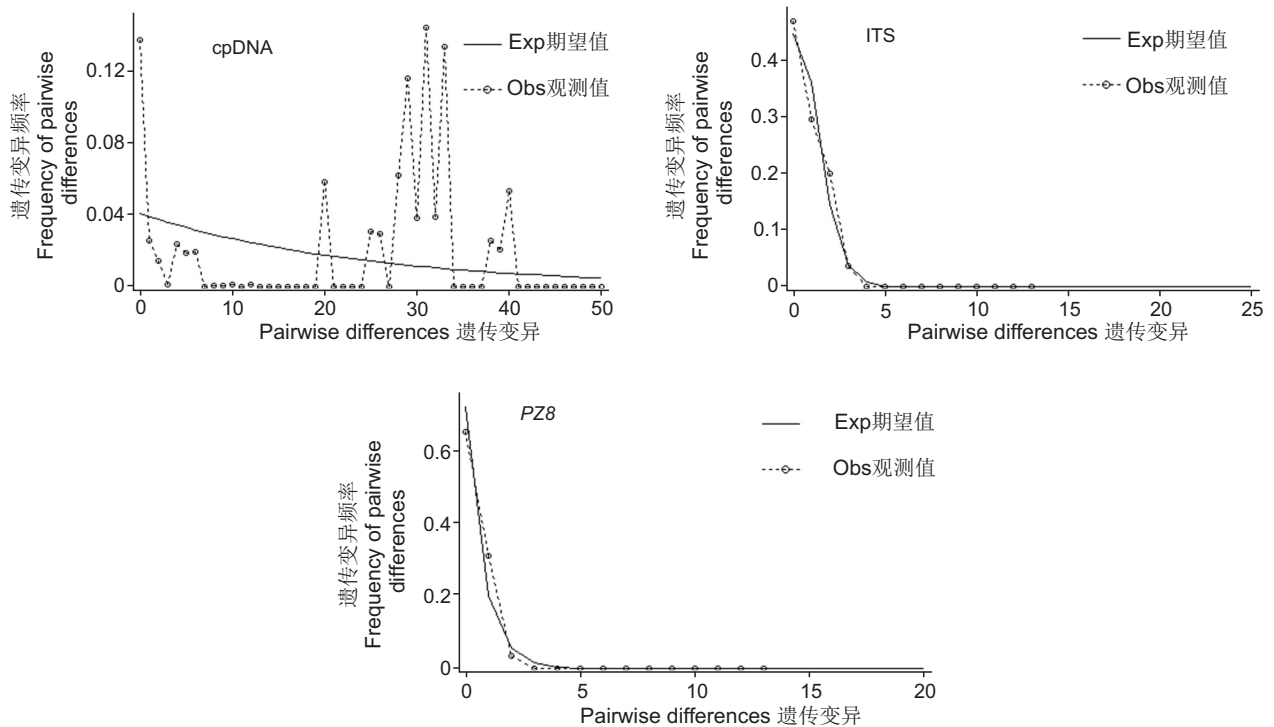


图 4 叶绿体 DNA、ITS 和 *PZ8* 序列数据的岐点分布
Fig. 4 Mismatch distributions of cpDNA, ITS, and *PZ8* data

经历过近期的种群扩张事件。因此, 基于 cpDNA 片段标记的中性检验和失配分布结果都说明龙血树柴胡没有经历过近期的种群扩张事件。

基于 ITS 片段标记分析的各项中性检验均为不显著的正值 ($Tajima's D = 1.460$, Fu and $Li's F = 1.003$), 表明 ITS 符合中性进化, 居群的 SSD 值 (0.006) 以及糙度指数 r 值 (0.052) 都为不显著的正值 ($P > 0.05$)。基于 $PZ8$ 数据分析的 $Tajima's D$ (-0.928) 和 Fu and $Li's F$ 值 (-2.575) 为负值, 但均不显著小于零 ($P > 0.05$), SSD 值 (0.010) 以及糙度指数 r 值 (0.192) 都为不显著的正值 ($P > 0.05$)。ITS 和 $PZ8$ 数据失配分布曲线显示为非明显单峰 (图 4)。因此, 核 DNA 数据的中性检验值和失配分析都显示龙血树柴胡未发生种群扩张事件。

3 讨论

中国西南地区被认为是世界生物多样性最丰富的地区之一, 由高山和峡谷造就的特殊的地理和气候特征使该地区拥有众多的特有及稀有或濒危植物物种^[2, 23, 24]。其中, 该区域众多的干热峡谷中分布着区域特有植物 40 余种, 中国特有植物 600 余种。这 40 余种特有植物中绝大多数分布在金沙江流域的干热河谷中^[2], 如攀枝花苏铁 (*Cycas panzhihuaensis* L. Zhou et S. Y. Yang)^[25]、金沙江石斛 (*Dendrobium wangliangii* G. W. Hu, C. L. Long & X. H. Jin)^[26]、丁茜 (*Trailliaedoxa gracilis* W. W. Smith et Forrest)^[27]等。而龙血树柴胡目前也仅被发现分布在金沙江流域的狭窄范围内。与一些干热河谷特有植物一样^[1], 龙血树柴胡 cpDNA 的遗传变异主要存在于居群间, 居群内遗传多样性水平低; 居群间的基因流较小 ($Nm = 0.1919$), 遗传分化明显 ($F_{st} = 0.959$, $G_{st} = 0.839$)。而 nDNA 片段揭示了龙血树柴胡的遗传多样性较低, 遗传变异主要存在于居群内部, 这与王馨蕊^[4]基于 SSR 标记研究的结果一致。尽管两个 nDNA 片段中只有依据 $PZ8$ 计算的基因流大于 1, 依据 ITS 计算的基因流小于 1 ($Nm = 0.3219$), 但是 STRUCTURE 聚类分析结果显示, 地理距离相对较远的 BSY 居群的遗传成分与其余居群明显不同。因此居群间由于遗传漂变的影响而很可能持续发生遗传分化。结合王馨蕊^[4]基于 SSR 标记研

究, 我们发现 cpDNA 与 nDNA 标记揭示的龙血树柴胡遗传多样性水平及变异分布模式存在差异, 这应该是由 cpDNA 是由种子传递的母系遗传而 nDNA 是由种子和花粉共同传递的双亲遗传的不同遗传体系造成的^[25]。分子标记的类型、居群的数目以及每个居群的取样大小都会影响一个物种遗传变异的计算结果^[28]。龙血树柴胡的种子在实验室条件下具有较高的活力和萌发率^[4], 但在野外每年开花结实的成年植株不多, 也未观察到大量实生苗。因此, 除了人为对栖息地的干扰和破坏, 种子在自然环境下的生存能力和远距离传播能力也会影响其遗传多样性分布式样。与龙血树柴胡同一属的北柴胡 (*B. chinense* DC.), ITS 分析结果显示其河南分布的 4 个野生居群整体具有较高的遗传多样性, 但部分地区遗传多样性偏低, 居群间的地理距离限制了种子介导的基因流^[29]。Zhao 等^[30]利用 3 个叶绿体 DNA 片段标记 *trnL-trnF*、*psbA-trnH* 和 *rps16* 研究了分布于秦岭、中国东部、东北部的另一柴胡属植物大叶柴胡 (*B. longiradiatum* Tung) 的遗传多样性和谱系地理, 结果显示其具有高的种内遗传多样性 ($H_t = 0.948$), 居群间遗传分化明显 ($F_{st} = 0.73281$), 具有显著的谱系地理结构。因此, 从以上 3 个柴胡属植物的研究可以看出, 柴胡属植物居群间基于叶绿体 DNA 数据的基因流普遍偏小, 遗传分化明显, 而基于核 DNA 数据的基因流相对较大, 居群间遗传分化不明显。因此我们推断, 柴胡属植物居群间遗传物质的交换主要是花粉介导的基因流造成的, 这与伞形科植物以蜂类等可长距离飞行的昆虫为主要传粉媒介的生物学特性相匹配^[31, 32]。

除了遗传变异分布式样的相似性, 龙血树柴胡居群历史动态也与一些金沙江干热河谷特有类群一样, 都未经历过居群扩张, 如攀枝花苏铁^[25]、丁茜^[27]、云南地黄连 (*Munronia delavayi* Franch.)^[33]、白菊木 (*Leucomeris decora* Kurz)^[34]、贯叶马兜铃 (*Aristolochia delavayi* Franch.)^[35] 以及滇榄仁 (*Terminalia franchetii* Gagnep.)^[36]。这些类群具有的共同特征是: 都分布在金沙江干热河谷相对低海拔的区域, 分布范围都非常狭窄。虽然第四纪冰期-间冰期的地质历史事件严重影响了喜马拉雅-横断山地区的气候和植被, 但是金沙江干热河谷局部环境相对稳定, 成为自第三纪以来

某些类群及其后裔的避难所^[37]，这可能是分布在该地区的某些植物类群在历史上未发生居群扩张的原因。

研究物种的遗传多样性及分布特征的一个重要目的就是为制定保护物种遗传多样性的策略提供参考^[38]。不同物种因其多样性水平高低以及遗传多样性分布格局的不同，采取的保护策略也应不同。对于遗传变异主要分布在居群内的物种，应选择优先居群进行保护，不需要保护太多的居群；而对于遗传变异主要分布在居群间的物种，制定保护策略时应把重点放在不同的居群上，居群内不需要包含太多的个体^[39]。此外，那些包含特殊单倍型或遗传物质的居群或者物种则应给予优先的保护，因为它们分类或遗传上最为独特因而不可替代^[40]。龙血树柴胡作为一个新近发现并发表的物种，还未获得人们足够的关注和重视，各居群分布点靠近轿子雪山自然保护区但都不在保护区内，目前未获得任何形式的保护。本研究发现 DCQ、SKS、XKD、JDW、PB 和 YZJ 6 个居群具有较高的遗传多样性，在保护策略制定中应重点关注。cpDNA 片段分析显示龙血树柴胡的总体遗传多样性较高，遗传分化显著，遗传变异主要存在于居群间，而 nDNA 片段分析显示龙血树柴胡的总体遗传多样性偏低，遗传变异主要存在于居群内。因此对于龙血树柴胡的遗传资源保护既要重视所保护的居群数目，又要重视居群内的个体数，即保护尽可能多的居群，同时每个居群保护尽可能多的个体。同时，单倍型分析的结果显示多个居群在 cpDNA 或 nDNA 上具有各自的特有单倍型，理论上应该被优先保护，如 BSY、SJC、DCQ、PB、SKS、XKD、YZJ 居群。由于龙血树柴胡野外个体数量有限，自然更新困难，因此，在尽量保护其遗传多样性的同时，通过人工干预的方式增加其野外居群和个体数量也非常的迫切和必要。只有这样，才有可能阻止或减缓其种群规模的不断减小。

参考文献：

- [1] Zhao YJ, Gong X. Diversity and conservation of plant species in dry valleys, southwest China[J]. *Biodivers Conserv*, 2015, 24(11): 2611–2623.
- [2] 金振洲. 滇川干热河谷种子植物区系成分研究[J]. *广西植物*, 1999, 19(1): 1–14.

Jin ZZ. The floristic study on seed plants in the dry-hot

valleys in Yunnan and Sichuan [J]. *Guihaia*, 1999, 19(1): 1–14.

- [3] Wang HC, He ZR, Wang YH, Sun H. *Bupleurum dracaenoides* (Subgenus *Bupleurum*, Apiaceae): a new shrubby species from southwestern China[J]. *Syst Bot*, 2013, 38(4): 1188–1195.
- [4] 王馨蕊. 龙血树柴胡的遗传多样性及种子萌发特性研究[D]. 昆明: 云南大学, 2016: 27–42.
- [5] Fraser DJ, Bernatchez L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units[J]. *Mol Ecol*, 2001, 10(12): 2741–2752.
- [6] Doyle J. DNA Protocols for Plants-CTAB Total DNA Isolation[M]. Berlin: Springer, 1991: 101–115.
- [7] Zhao ZC, Liu J, Zhou MM, Pan YZ. Chloroplast genome characterization of *Bupleurum dracaenoides*, a critically endangered woody species endemic to China, with insights of Apioideae phylogeny[J]. *Gene Reports*, 2020, 20: 100784.
- [8] Li MR, Wang XF, Zhang C, Wang HY, Shi FX, et al. A simple strategy for development of single nucleotide polymorphisms from non-model species and its application in *Panax* [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12): 24581–24591.
- [9] Swindell SR, Plasterer TN. SEQMAN: contig assembly [J]. *Methods Mol Biol*, 1997, 70(70): 75.
- [10] Hall TA. 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.
- [11] Swofford DL. PAUP *: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). version 4. [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2003.
- [12] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [13] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585–595.
- [14] Fu YX, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations [J]. *Genetics*, 1993, 133(3): 693–709.
- [15] Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Mol Ecol Res*, 2010, 10(3): 564–567.
- [16] Nielsen R. Molecular signatures of natural selection [J]. *Ann Rev Gen*, 2005, 39(1): 197–218.
- [17] Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Mol Biol and Evol*, 1992, 9(3): 552–569.
- [18] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations, Volume 4: Variability Within and Among Natural Populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978:

- 1–100.
- [19] McCauley DE. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants[J]. *Trends Ecol Evol*, 1995, 10(5): 198–202.
- [20] Pons O, Petit RJ. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles[J]. *Genetics*, 1996, 144(3): 1237–1245.
- [21] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611–2620.
- [22] Earl DA, vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method[J]. *Cons Gen Res*, 2012, 4(2): 359–361.
- [23] Sun H, Zhang J, Deng T, Boufford DE. Origins and evolution of plant diversity in the Hengduan Mountains, China[J]. *Plant Divers*, 2017, 39(4): 161–166.
- [24] Sun H, Li Z, Landis JB, Qian L, Zhang T, *et al.* Effects of drainage reorganization on phylogeographic pattern in Sino-Himalaya[J]. *Alpine Bot*, 2021. <https://org/10.1007/s00035-021-00269-4>.
- [25] Xiao S, Ji Y, Liu J, Gong X. Genetic characterization of the entire range of *Cycas panzhihuaensis* (Cycadaceae)[J]. *Plant Divers*, 2020, 42(1): 7–18.
- [26] Hu GW, Long CL, Jin XH. *Dendrobium wangliangii* (Orchidaceae), a new species belonging to section *Dendrobium* from Yunnan, China[J]. *Bot J Linn Society*, 2008, 157(2): 217–221.
- [27] Jia J, Zeng LQ, Gong X. High genetic diversity and population differentiation in the critically endangered plant species *Trailliaedoxa gracilis* (Rubiaceae)[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2016, 34(1): 327–338.
- [28] Reisch C, Bernhardt RM. The impact of study design and life history traits on genetic variation of plants determined with AFLPs[J]. *Plant Ecol*, 2014, 215(12): 1493–1511.
- [29] 袁王俊, 张维瑞, 尚富德. 河南产不同居群柴胡遗传多样性分析[J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1166–1169.
- Yuan WJ, Zhang WR, Shang FD. Analysis on genetic diversity of *Bupleurum chinense* from different geographical populations in Henan Province[J]. *Chinese Trad Herb Drugs*, 2012, 43(6): 1166–1169.
- [30] Zhao C, Wang CB, Ma XG, Liang QL, He XJ. Phylogeographic analysis of a temperate-deciduous forest restricted plant (*Bupleurum longiradiatum* Turcz.) reveals two refuge areas in China with subsequent refugial isolation promoting speciation[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2013, 68(3): 628–643.
- [31] 张振春. 两种伞形科植物雄全同株性系统的生态适应对策[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2009.
- [32] 张振春, 谭敦炎. 雄全同株植物簇花芹花期性别分配与开花式样[J]. *植物生态学报*, 2012, 36(1): 63–71.
- Zhang ZC, Tan DY. Floral sex allocation and flowering pattern in the andromonocious *Soranthus meyeri* (Apiaceae)[J]. *Chinese J Plant Ecol*, 2012, 36(1): 63–71.
- [33] Jia J, Wu H, Wang JF, Gong X. Genetic diversity and structure of *Munronia delavayi* Franch. (Meliaceae), an endemic species in the dry-hot valley of Jinsha River, south-western China[J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2014, 61(7): 1381–1395.
- [34] Zhao YJ, Gong X. Genetic structure of the endangered *Leucomeris decora* (Asteraceae) in China inferred from chloroplast and nuclear DNA markers[J]. *Conserv Genet*, 2011, 13(1): 271–281.
- [35] Yang ZY, Yi TS, Zeng LQ, Gong X. The population genetic structure and diversification of *Aristolochia delavayi* (Aristolochiaceae), an endangered species of the dry hot valleys of the Jinsha River, southwestern China[J]. *Botany*, 2014, 92: 579–587.
- [36] Zhang T, Sun H. Phylogeographic structure of *Terminalia franchetii* (Combretaceae) in southwest China and its implications for drainage geological history[J]. *J Plant Res*, 2011, 124(1): 63–73.
- [37] 金振洲, 杨永平, 陶国达. 华西南干热河谷种子植物区系的特征、性质和起源[J]. *云南植物研究*, 1995, 172(2): 129–143.
- Jin ZZ, Yang YP, Tao GD. The floristic characteristics, nature and origin of seed plants in the dry-hot river valley of SW China[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1995, 17(2): 129–143.
- [38] Montalvo AM, Buchmann SL, Rice KJ, Buchmann SL, Cory C. Restoration biology: a population biology perspective[J]. *Rest Ecol*, 1997, 5(4): 277–290.
- [39] 李昂, 葛颂. 植物保护遗传学研究进展[J]. *生物多样性*, 2002, 10(1): 61–71.
- Li A, Ge S. Advances in plant conservation genetics[J]. *Biodiversity Science*, 2002, 10(1): 61–71.
- [40] Falk DA, Holsinger KE. Genetics and Conservation of Rare Plants[M]. New York: Oxford University Press, 1991.

(责任编辑: 周媛)