

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.60815

胡普伟, 段磊, 王美娜, 王铮峰, 陈红锋. 基于 AFLP 分析的伯乐树 (*Bretschneidera sinensis*) 谱系地理学研究[J]. 植物科学学报, 2017, 35(6): 815-824Hu PW, Duan L, Wang MN, Wang ZF, Chen HF. Phylogeographic study on *Bretschneidera sinensis* inferred from AFLP data[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(6): 815-824

基于 AFLP 分析的伯乐树 (*Bretschneidera sinensis*) 谱系地理学研究

胡普伟^{1,2}, 段磊¹, 王美娜^{1,2}, 王铮峰¹, 陈红锋^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 伯乐树 (*Bretschneidera sinensis* Hemsl.) 是主要分布于中国的濒危物种。采用 AFLP 分子标记对分布于中国 11 个省的 24 个伯乐树居群 192 个个体进行谱系地理学研究。结果显示, 伯乐树有相对较高的遗传多样性水平, 基因多样性指数 (H_e) 和 Shannon 指数 (I) 分别为 0.2728 和 0.4070。伯乐树居群间的遗传分化远大于居群内遗传分化, 遗传分化系数 $G_{ST} = 0.7138$, 基因流 $N_m = 0.2005$ 。通过聚类分析、STRUCTURE 分析和 BAPS 分析发现, 24 个伯乐树居群可形成 4 大地理居群组和进化谱系; 云贵高原东部地区居群遗传多样性较高, 可能是伯乐树在中国的扩散中心和冰期避难所, 伯乐树在冰期后由此向外进行居群扩散; 南岭地区各居群遗传多样性水平普遍高于其他地区, 与邻近地区各居群的亲缘关系较近, 可能为伯乐树演化历史上的另一个冰期避难所。

关键词: 伯乐树; 谱系地理学; AFLP; 遗传结构; 冰期避难所

中图分类号: Q948

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)06-0815-10

Phylogeographic study on *Bretschneidera sinensis* inferred from AFLP data

Hu Pu-Wei^{1,2}, Duan Lei¹, Wang Mei-Na^{1,2}, Wang Zheng-Feng¹, Chen Hong-Feng^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Bretschneidera sinensis* Hemsl. is a rare plant species mainly distributed in China. In this study, amplified fragment length polymorphism (AFLP) data were used to analyze genetic diversity, genetic structure, and phylogeography of this species. A total of 192 individuals from 24 populations in 11 provinces were sampled. Results showed a relatively high level of genetic diversity for *B. sinensis*, with an expected heterozygosity (H_e) and Shannon's diversity index (I) of 0.2728 and 0.4070, respectively. Relatively high genetic differentiation ($G_{ST} = 0.7138$) and lower gene flow ($N_m = 0.2005$) among *B. sinensis* populations were detected. The intra-population genetic variations were significantly greater than the inter-population variations. Four phylogeographic groups were discovered from cluster, STRUCTURE, and BAPS analyses. Populations in the East Yungui Plateau showed high levels of genetic diversity with unique hereditary constitution. This area is a possible diversity center and glacial refuge for *B. sinensis* in China, which expanded northward, eastward, and southeastward after the last ice age. Populations from the Nanling Mountains, with a close

收稿日期: 2017-05-10, 退修日期: 2017-06-02。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170196, 31570337)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31170196, 31570337)。

作者简介: 胡普伟 (1986-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物分类与谱系地理学 (E-mail: hu.puwei@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: h.f.chen@scbg.ac.cn)。

relationship to their neighbor population, had higher genetic diversity than other areas. The Nanling Mountains are another probable glacial refuge in the evolutionary history of *B. sinensis*.

Key words: *Bretschneidera sinensis*; Phylogeography; AFLP; Genetic structure; Glacial refugia

伯乐树 (*Bretschneidera sinensis* Hemsl.) 为伯乐树科 (Bretschneideraceae) 伯乐树属落叶乔木, 又名钟萼木或山桃花, 是以中国为分布中心的单种科、单种属植物。伯乐树最初仅在我国境内发现, 主要零星分布于我国长江以南各省区的山区地带, 后在越南、缅甸和泰国北部地区也有少量发现^[1, 2]。长期以来, 原生境的破坏和人为干扰使得伯乐树野生种群数量锐减, 加之天然结实率低、自然更新困难, 使伯乐树处于濒危状态^[3], 被中国物种红色名录评估为濒危等级^[4], 并被列为国家 I 级重点保护野生植物^[5]。伯乐树起源古老、分布稀少, 具有极高的科研和保护价值。

近年来, 已对伯乐树的遗传多样性与谱系地理学进行了研究^[2, 6-14]。其中, 多数研究结果认为伯乐树居群间的遗传多样性差异大于居群内, 并且遗传距离与地理距离呈正相关^[2, 8, 9, 11, 13, 14]。但是上述研究的取样地理范围具有一定的局限性, 无法涵盖伯乐树的大部分分布区; 且上述研究中采用 IS-SR 方法较多^[6, 8, 9, 11, 13], 对其他分子标记或基因片段关注较少。

笔者所在团队以广东伯乐树居群为主要研究对象, 以居群生态学、生态解剖学以及传粉生物学为重点展开了保护生物学方面的研究^[15, 16], 并在此基础上全面采集了全国分布的伯乐树居群样品, 涵盖国内除四川省外伯乐树分布的所有省份^[1]。在此, 笔者首次采用双亲遗传的 AFLP 分子标记方法^[2]对伯乐树居群进行遗传多样性与谱系地理学研究, 通过分析不同地理分布的伯乐树居群的遗传多样性和遗传结构, 探讨居群间的亲缘关系, 同时结合生态、地理分布状况和地史资料, 推测伯乐树可能存在的起源中心和冰期避难所, 以期为伯乐树的保护、利用以及种群恢复提供理论依据和重要基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究从我国伯乐树分布地选取 24 个分布点作为实验样品采集点, 共采集全国 11 个省 24 个居群 (表 1), 平均每个省 1 ~ 3 个采集点。各种群

个体间距 30 m 以上, 尽可能采集野外调查过程中见过的所有伯乐树个体。每个个体采集 2 ~ 4 片新鲜、无虫害、干净的叶片 (最好是嫩叶), 放入装有硅胶的封口袋并用记号笔标注号码。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取

在每个居群中选取状态较好的 8 个个体, 因在湖南莽山仅取到 7 个个体, 故全部采用。采用改进的 CTAB 法^[17]提取伯乐树叶片总 DNA, 取 1 μ L DNA 原液与 49 μ L 双蒸水混匀, 用紫外可见分光光度计进行 DNA 质量和浓度检测。

1.2.2 AFLP 分析

1.2.2.1 基因组 DNA 的酶切检测

酶切体系为: ddH₂O 5.65 μ L, 10 \times NE buffer 4.0 μ L, *Eco*RI 0.25 μ L, *Mse*I 0.1 μ L, DNA 10 μ L, 共 20 μ L。酶切反应程序为: 37 $^{\circ}$ C 保温 3 h, 65 $^{\circ}$ C 灭活酶 20 min, 将溶液用接头连接或放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

1.2.2.2 *Eco*RI 和 *Mse*I 接头退火

按照产品说明书将接头溶解至 100 μ mol/L 的两对接头, 同体积混合稀释至 50 μ mol/L, 进行退火, 结束后放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

1.2.2.3 *Eco*RI 和 *Mse*I 接头连接

*Eco*RI 接头序列为: 5'-CTCGTAGACTGCGTAC-CCATCTGACGCATGGTTAA-5'; *Mse*I 接头序列为: 5'-GACGATGAGTCCTGAGTACTCAGGACTCAT-5'。接头连接反应体系为: ddH₂O 3.1 μ L, 10 \times T4 DNA ligase buffer 1.0 μ L, *Eco*RI adaptor (50 pm/ μ L) 0.4 μ L, *Mse*I adaptor (50 pm/ μ L) 0.4 μ L, T4 DNA ligase (350 U/ μ L) 0.1 μ L, DNA 酶切产物 5 μ L, 共 10 μ L。反应程序为: 16 $^{\circ}$ C 反应 3 h, 取出, 稀释 10 倍用做 PCR 反应模板或放入冰箱 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.2.4 PCR 预扩增

预扩增引物 *Eco*RI + A: GACTGCGTACCAATTCA, *Mse*I + C: GATGAGTCCTGAGTAAC。预扩增反应体系为: ddH₂O 13.0 μ L, 10 \times buffer 2.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/ μ L) 2.4 μ L, *Eco*RI-A

表 1 各居群的总条带数、多态性条带百分比、香农信息指数 (*I*) 和期望杂合度 (*He*)

Table 1 Total bands, percentage of polymorphic bands, Shannon's information index (*I*), and Expected diversity (*He*) for 24 populations

居群 Population	总条带数 Total bands	多态条带百分比 (%) Polymorphic bands	香农信息指数 (<i>I</i>) Shannon's information index	期望杂合度 (<i>He</i>) Expected diversity
1. 福建关坪	62	21.53	0.1053 ± 0.2122	0.0685 ± 0.1426
2. 福建南平	44	15.28	0.0776 ± 0.1933	0.0513 ± 0.1319
3. 广东始兴	72	25.00	0.1351 ± 0.2446	0.0906 ± 0.1680
4. 广东从化	48	16.67	0.0737 ± 0.1805	0.0472 ± 0.1216
5. 广东连州	57	19.79	0.0950 ± 0.2053	0.0619 ± 0.1390
6. 广东龙潭角	40	13.89	0.0731 ± 0.1899	0.0486 ± 0.1295
7. 广东惠州	49	17.01	0.0835 ± 0.1987	0.0550 ± 0.1362
8. 广东清远	64	22.22	0.1058 ± 0.2139	0.0689 ± 0.1456
9. 广东小黄山	55	19.10	0.0946 ± 0.2081	0.0622 ± 0.1420
10. 广西龙胜	57	19.79	0.0968 ± 0.2084	0.0634 ± 0.1414
11. 广西金秀	74	25.69	0.1385 ± 0.2482	0.0932 ± 0.1715
12. 贵州黎平	61	21.18	0.1114 ± 0.2248	0.0741 ± 0.1534
13. 海南白沙	63	21.88	0.1080 ± 0.2203	0.0713 ± 0.1512
14. 湖南桂东	79	27.43	0.1474 ± 0.2559	0.0996 ± 0.1786
15. 湖南东安	74	25.69	0.1233 ± 0.2253	0.0802 ± 0.1522
16. 湖北恩施	74	25.69	0.1346 ± 0.2404	0.0894 ± 0.1640
17. 湖南莽山	126	43.75	0.2314 ± 0.2849	0.1554 ± 0.1988
18. 湖南新宁	75	26.04	0.1324 ± 0.2389	0.0878 ± 0.1643
19. 江西龙南	80	27.78	0.1507 ± 0.2554	0.1014 ± 0.1768
20. 江西崇义	81	28.12	0.1346 ± 0.2315	0.0874 ± 0.1566
21. 台湾台北	69	23.96	0.1232 ± 0.2330	0.0818 ± 0.1593
22. 云南屏边	64	22.22	0.1201 ± 0.2339	0.0805 ± 0.1602
23. 浙江景宁	53	18.40	0.0907 ± 0.2043	0.0596 ± 0.1391
24. 浙江龙泉	74	25.69	0.1399 ± 0.2491	0.0941 ± 0.1717
At the species level	231	80.21	0.2728 ± 0.1926	0.4070 ± 0.2647

(10 pm/μL) 0.2 μL, *Mse*I-C (10 pm/μL) 0.2 μL, *rTaq* 酶(5 U/μL) 0.2 μL, 连接产物(1 : 10 稀释) 2 μL, 共计 20 μL。反应程序为: 75℃扩增 120 s、94℃扩增 30 s、56℃扩增 30 s、72℃扩增 120 s, 共 19 个循环, 最后 60℃保温 30 min 结束。

1.2.2.5 选择性扩增

引物筛选: 用 8 个具有 3 个选择性碱基的 E-primers(+3) 和 8 个具有 3 个选择性碱基的 M-primers(+3) 进行组合, 一共得到 64 个引物的选择性扩增结果。通过琼脂糖电泳鉴定, 进行引物初步筛选, 然后从每个居群中挑选出两个个体, 利用初步筛选出的引物进行 PCR 选择性扩增, 通过 ABI-3730 自动测序仪对 PCR 产物进行电泳, 最后从这些引物中筛选出可扩增数量适中、多态性较高、易判读、可重复条带的 6 对引物组合用于扩增。

选择性扩增反应体系及反应条件: 将预扩增产物稀释 50 倍后作为模板, 进行选择 PCR 扩增, PCR 扩增反应程序采用 Touchdown PCR。选择性扩增反应体系为: ddH₂O 9.8 μL, 10 × buffer

2.0 μL, dNTP (2.5 mmol/μL) 2.0 μL, E primer (荧光标记, 10 pm/μL) 0.3 μL, M primer(10 pm/μL) 0.5 μL, *rTaq* 酶(5 U/μL) 0.4 μL, 预扩增产物(1 : 50 稀释) 5 μL, 共计 20 μL。反应程序为: 94℃扩增 300 s, 然后以 94℃扩增 30 s、65℃~56℃(−0.7℃/cycle) 扩增 30 s、72℃扩增 60 s 为一个循环, 共 13 个循环; 再以 94℃扩增 30 s、56℃扩增 30 s、72℃扩增 30 s 为一个循环, 共 23 个循环; 最后 72℃保温 8 min 结束。

1.2.2.6 荧光检测

PCR 反应结束后, 将产物稀释 30 倍, 将 0.2 mL ET-ROX-500 与 ddH₂O 混合, 取 1.5 μL 样品与 6 μL ET-ROX-500 混合液混合, 置于 95℃变性 10 min, 变性后的样品通过自动测序仪 ABI-3730 进行电泳检测, 获得扩增片段数据。

1.2.3 数据统计与分析

1.2.3.1 条带的统计

将 ABI-3730 自动测序仪测得的结果导入 Genemarker V1.7, 对条带进行统计。根据峰值有

无及强度，统计 50 ~ 500 bp 以内的条带，有条带记为 1，无条带记为 0，将文件保存为 Excel 格式的二进制矩阵，以备后续分析。

去掉峰值无法判断的个体，以及仅有一个个体有条带或者无条带的位点，统计总条带数 (F_T)，计算多态性条带百分比 (F_{POLY})。利用 AFLPdat 软件计算各种群特有条带数目 (F_{PP})、各地理区域特有条带数目 (F_{PR})，并利用此软件将得到的二进制矩阵转化为各软件分析所需的格式。

1. 2. 3. 2 居群遗传多样性分析与遗传结构分析

采用 POPGENE 软件进行分子遗传分析，计算遗传分化系数 G_{ST} 。采用 POPGENE 软件计算遗传多样性指数期望杂合度 He (expected heterozygosity)、香农信息指数 I (Shannon’s information index)、基因流 N_m (gene flow)、遗传距离 D (genetic distance) 与多态位点百分比 P (percentage of polymorphic loci)。

利用 NTSYS 进行基于 Nei’s and Li’s 遗传距离的 UPGMA 聚类分析。利用贝叶斯算法，根据多个位点基因型的不同，可以将不同的个体分配到不同的居群中。本研究采用最常用的软件 STRUCTURE 以及 BAPS 进行分析。BAPS 将等位基因频率和遗传分化的组处理为随机变量。使用 Stochastic optimisation 选项用于推断遗传结构的后验参数。首先创建个体编号和相应居群代码的两个文本文件，然后在 Mixture 模式下进行个体聚类分析，对原始数据进行预处理，设置最大居群数为 2 ~ 24，各次运算重复 5 次，对预处理的数据进行 Admixture 模型下的个体聚类分析。最小居群设置

为 3，重复次数为 200，涉及到的个体数为 100，进行个体的混合系数计算的重复次数为 15。

利用马尔可夫蒙特卡罗方法进行计算，通过比较不同 K 值的各次运算结果来寻找最适的 K 值，根据等位基因频率，不同的个体被分配到不同的组中。在 Structure 2.3 中，将参数设置为 Length of Burnin Period = 100000，MCMC Reps after Burnin = 50000，选择 No Admixture 模型，以 $K = 1 \sim 10$ 进行计算，每一个 K 值重复 10 次。利用 R 语言为操作背景的 Structure-Sum 程序对不同的 K 值进行分析比较，找出最适合的 K 值。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

对 64 个选择性扩增引物进行筛选实验，通过琼脂糖凝胶电泳，初步筛选出 14 对引物，通过对部分样品进行扩增，最终筛选出 6 对可扩增出数量适中、多态性较高、易判读、可重复条带的引物组合，它们分别是：*EcoRI*-ACA (*FAM*)/*MseI*-CTC、*EcoRI*-ACT (*FAM*)/*MseI*-CTC、*EcoRI*-ACG (*FAM*)/*MseI*-CTC、*EcoRI*-ACT (*FAM*)/*MseI*-CTG、*EcoRI*-ACT (*FAM*)/*MseI*-CAC、*EcoRI*-ACT (*FAM*)/*MseI*-CAG (表 2)。

2.2 条带统计和遗传多样性

利用 ABI-3730 自动测序仪对送测样品进行检测，并对检测结果及其峰值图进行人工校对、补带，最终 6 对引物对 192 个个体共扩增条带 288 条。扩增片段长度为 52 ~ 499 bp，平均每对引物扩增条带 48 条，其中多态性条带 196 条，每对引

表 2 AFLP 各引物对扩增的条带数
Table 2 Numbers of bands amplified from six AFLP primer pairs

引物组合 Primer pairs	序列 Sequence (5'-3')	总条带数 Total bands	多态性条带 Polymorphic bands	多态性条带百分比 (%) Polymorphic bands
1. <i>EcoRI</i> -ACA / <i>MseI</i> -CTC	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'	49	26	53.06
2. <i>EcoRI</i> -ACT / <i>MseI</i> -CTC	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'	60	51	85.00
3. <i>EcoRI</i> -ACG / <i>MseI</i> -CTC	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'	39	25	64.10
4. <i>EcoRI</i> -ACT / <i>MseI</i> -CTG	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'	43	30	69.77
5. <i>EcoRI</i> -ACT / <i>MseI</i> -CAC	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'	48	34	70.83
6. <i>EcoRI</i> -ACT / <i>MseI</i> -CAG	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'	49	30	61.22
Total		288	196	68.06

物所扩增条带的平均多态性百分率为 68.06% (表 2)。6 对引物组合扩增的条带数为 39 ~ 60 条。多态性条带百分率最高的引物组合为 *Eco*RI-ACT / *Mse*I-CTC (85.00%)，多态性条带百分率最低的引物组合为 *Eco*RI-ACA / *Mse*I-CTC (53.06%)。

从整体地理区域水平上看(表 1)，遗传多样性水平较高的居群多集中分布在南岭山脉两侧，遗传多样性水平在 0.0906 ~ 0.1554 之间。南岭山脉以北地区的伯乐树居群多样性水平为 0.0802 ~ 0.0996，云南、贵州、广西地区为 0.0622 ~ 0.0932，长江中下游地区为 0.0513 ~ 0.0941。遗传多样性水平最低的地区是南岭山脉以南地区 (0.0472 ~ 0.0713)。从单个居群水平来看，遗传多样性水平最高的是湖南莽山居群 (0.1554)，其次是江西龙南居群 (0.1014) 和湖南桂东居群 (0.0996)；而遗传水平多样性最低的是来自南岭山脉以南地区的广东龙潭角居群 (0.0486) 和广东从化居群 (0.0472)。分布在岛屿上的台湾台北和海南白沙居群的遗传多样性水平分别为 0.0818 和 0.0713，与所有居群的平均遗传多样性水平相当。

从扩增的条带数目来看(表 1)，各居群平均扩增条带 66.5 条，各居群平均多态性条带百分比为 24.57%；扩增条带数目最多的是位于南岭山脉北侧的湖南莽山居群 (126 条)，最少的是位于南岭山脉南侧的广东龙潭角居群 (40 条)，同时遗传多样性最为丰富的南岭山脉地区平均扩增条带数为 92.7 条。长江中下游地区平均扩增出的条带数为 62.7 条，多态性条带百分比为 15.28% ~ 25.69%，湖北恩施居群的多态性条带最多；云南、贵州、广西地区各居群扩增出的条带总数多在 57 ~ 74 之间，多态性条

带百分比为 19.79% ~ 25.69%，其中广西金秀居群的总条带 (74 条) 和多态性条带数 (19 条) 最多。南岭山脉南、北区域的多态性条带百分比分别为 13.89% ~ 22.22% 和 25.69% ~ 28.12%。另外，岛屿居群 (台湾台北、海南白沙居群) 的扩增条带数为 69 和 63 条，其中多态性条带分别为 17 和 14 条。

2.3 居群遗传结构

对中国地区的 24 个伯乐树居群进行 POPGENE 分子遗传多样性分析，计算伯乐树居群的各项遗传多样性指数 (表 3) 和遗传分化系数 (表 4)，结果表明，伯乐树居群的遗传多样性较高；居群间遗传分化远大于居群内遗传分化；遗传变异主要存在于居群间，而非居群内部。检测的居群间遗传分化系数 $G_{ST} = 0.7138$ ，按照 Wright^[18] 描述居群间分化标准，表明伯乐树居群间的分化程度高。基因流 $N_m = 0.2005 < 1$ ，说明伯乐树各居群间基因交流少，加剧了各居群间的遗传分化。

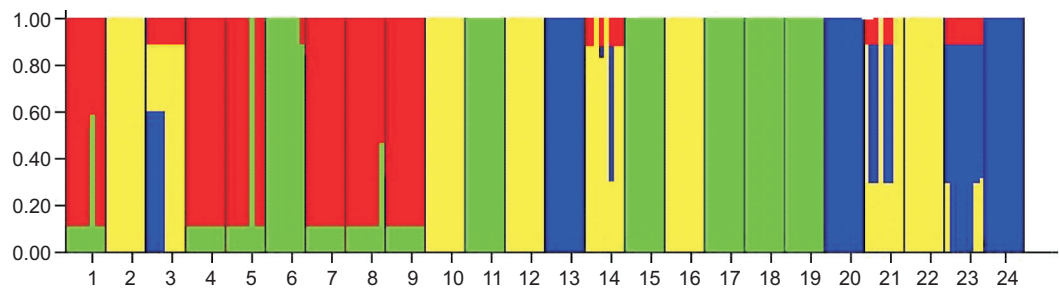
对伯乐树 24 个居群的数据进行分配计算，基于贝叶斯算法的 STRUCTURE 和 BAPS 的计算结果一致 (图 1、图 2)，得出的最适值 $K = 4$ ，其中大部分广东 (3 ~ 9)、湖南居群 (14 ~ 18) 的个体都分别归为一组；海南白沙 (13)、江西崇义 (20)、浙江景宁 (23) 和浙江龙泉 (24) 归为一组。但广东始兴 (3)、湖南桂东 (14)、台湾台北 (21) 和浙江景宁 (23) 居群的个体分配极不均一。另外，取 $K = 1 \sim 10$ 中每个 K 值重复 10 次，估测其对数概率，结果显示 $K = 4$ 时为最佳 ($K = 2$ ，将 24 个居群分为两个地理居群组，与聚类分析结果两大聚类支相吻合； $K = 9$ 时无实际价值)，因此，支持将 24 个伯乐树居群分为 4 个地理居群组 (图 4)。

表 3 伯乐树居群的遗传多样性分析
Table 3 Genetic diversity analysis of 24 populations of *Bretschneidera sinensis*

统计指标 Statistical indexes	可观测等位基因数 N_a Number of observable alleles	有效等位基因 N_e Number of effective alleles	Nei's 遗传多样性指数 H Nei's genetic diversity index	香农多样性指数 I Shannon's diversity index
位点平均值 S_a Site average value	1.8021	1.4735	0.2728	0.4070
标准差 S_d Standard deviation	0.3391	0.3778	0.1926	0.2647

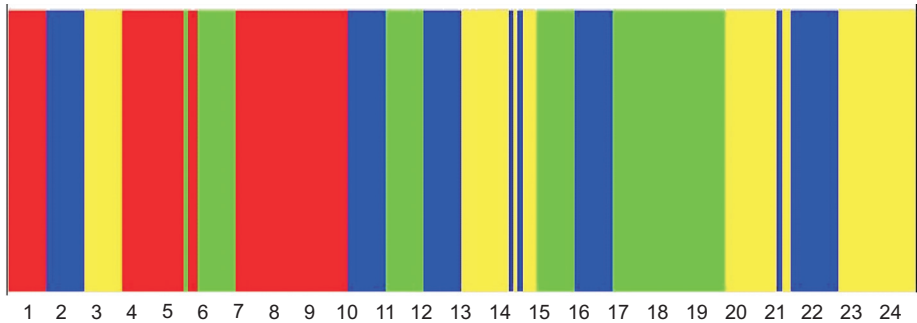
表 4 伯乐树居群的遗传分化系数
Table 4 Genetic differentiation coefficient of 24 populations of *Bretschneidera sinensis*

统计指标 Statistical indexes	总遗传多样性 H_t Total genetic diversity	居群内遗传多样性 H_s Genetic diversity within populations	遗传分化系数 G_{ST} Genetic differentiation coefficient	基因流 N_m Gene flow
位点平均值 S_a Site average value	0.2728	0.0781	0.7138	0.2005
标准差 S_d Standard deviation	0.0371	0.0054		



当 $K=4$ 时，广东居群(3 ~ 9)与湖南居群(14 ~ 18)出现明显的遗传分化。
Showing the genetic divergence of populations from Guangdong (3-9) and Hunan (14-18), $K = 4$.

图 1 STRUCTURE 计算结果
Fig. 1 STRUCTURE analysis results



当 $K = 4$ 时，广东居群(3 ~ 9)与湖南居群(14 ~ 18)出现明显的遗传分化。
Showing the genetic divergence of populations from Guangdong (3-9) and Hunan (14-18), $K = 4$.

图 2 BAPS 计算结果
Fig. 2 BAPS analysis results

利用 BAPS 对 24 个伯乐树居群所有个体的 AFLP 数据进行贝叶斯分析(图 3)。在 $K = 2$ 时，广东居群(3 ~ 9)、湖南居群(14 ~ 18)首先与其他地区的居群分开，形成两大地理居群组；在 $K = 3$ 时，形成较为明显的 3 个地理居群组(由 3 种不同颜色代表)；而在 $K = 4$ 时，广东地区居群(3 ~ 9)出现更为严格的遗传分化(图 2)，部分居群分开分属不同的地理居群组。

2.4 聚类分析

利用 NTSYS 基于遗传距离对中国伯乐树 24 个居群进行 UPGMA 聚类分析(图 4)，结果显示，所有 24 个伯乐树居群可形成 4 大聚类分支：(1)南岭山脉以南支：包括南岭以南的广东绝大多数居群和福建、湖南部分居群聚类在一起，形成最大的一个聚类支；(2)滇黔桂支：同时包括其周边(粤、湘、鄂、琼)部分居群，形成了另一较大的聚类支；(3)南岭山脉以北支：包括湖南莽山、新宁和江西龙南居群，形成了一聚类支；(4)长江中下游支：包括浙江、江西和台湾等省份居群，形成了一聚类支。总体来看，伯乐树各居群的遗传结构与地理分布基本保持一致，但部分地理位置分隔较远的居群

间分化程度较低，如台湾台北居群和海南白沙居群。

3 讨论

3.1 伯乐树的遗传多样性

在种内水平上，本研究通过 AFLP 分子标记对伯乐树遗传多样性的研究结果显示，伯乐树遗传多样性指数(He)和香农信息多样性指数(I)分别为 0.2728 和 0.4070，与林国锋^[8]利用 ISSR 分子标记研究福建省 7 个伯乐树居群的遗传多样性水平相似。通常认为珍稀濒危植物、分布区狭窄种和特有植物在遗传多样性水平上普遍较低，但也有研究认为某些分布范围较狭窄的珍稀濒危植物也具有较高的遗传多样性水平，如马蹄香(*Saruma henryi* Oliv.)为 0.939^[19]，长柄水青冈(*Fagus longipetiolata*)为 0.793^[20]，说明遗传多样性水平的高低与植物广布与否并无明显的相关关系。

本研究利用 AFLP 分子标记分析得出的多态性位点百分率(P)达到了 68.06%。另外，多态位点百分率作为度量遗传变异水平高低的一项重要指标，也客观地反映出伯乐树较高的遗传多样性水平^[2]。但相对于 ISSR 和 RAPD 分子标记，AFLP 分子标记

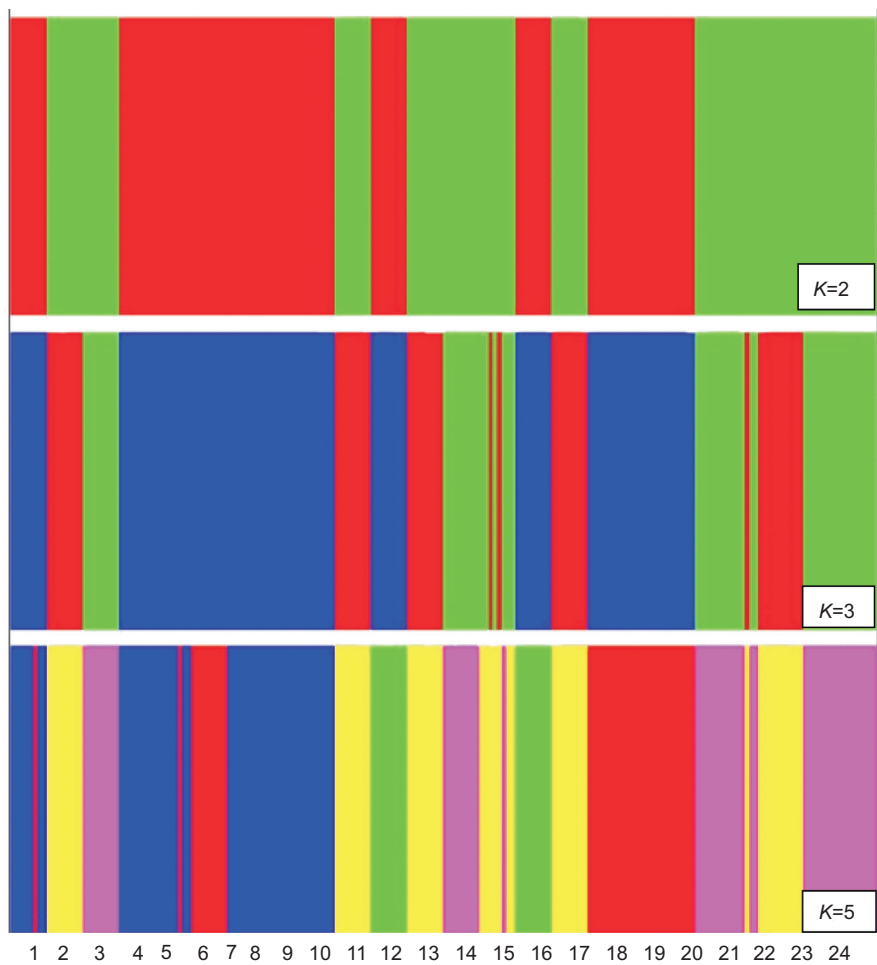


图 3 利用 BAPS 计算的 $K = 2, 3$ 和 5 时伯乐树居群不同的分组情况
Fig. 3 Grouping results of BAPS analyses of all *Bretschneidera sinensis* populations, $K = 2, 3$, and 5, respectively

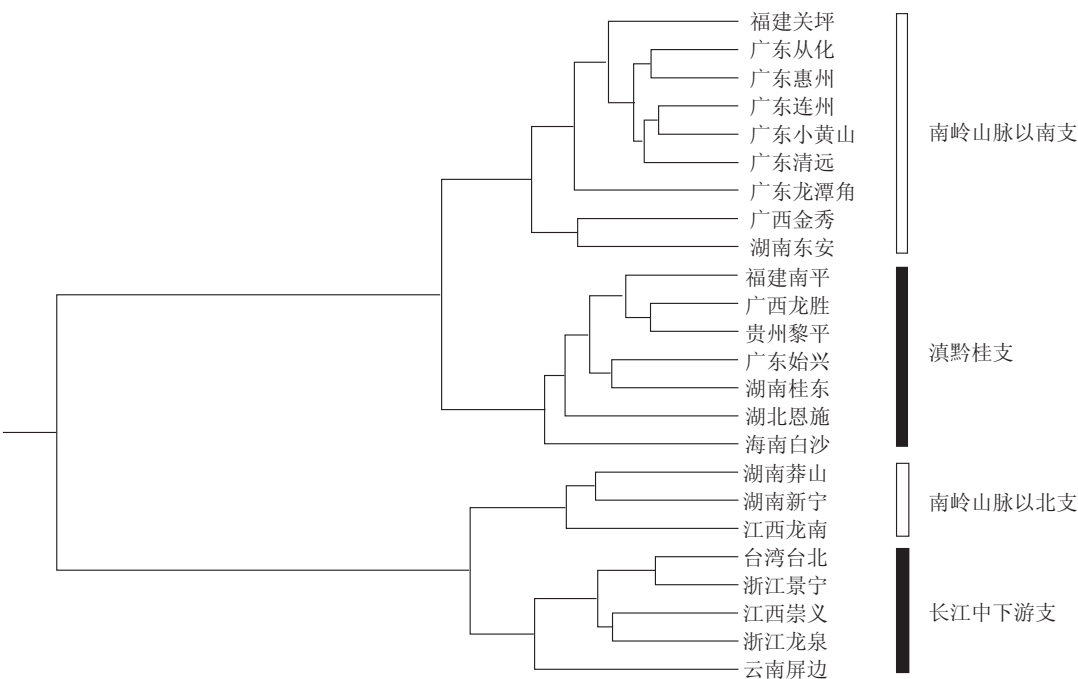


图 4 基于 Nei's & Li's 遗传距离的 24 个伯乐树居群的 UPGMA 聚类分析
Fig. 4 UPGMA analysis of 24 populations of *Bretschneidera sinensis* based on Nei's & Li's genetic distances

的揭示力可能更强,能检测到更高的多态性^[21, 22]。

从以上分析结果可知,伯乐树具有相对较高的遗传多样性,这可能与其自身的生活史特性有关。虽然现有伯乐树野生资源稀少,且仅在中国南部、越南、泰国北部零星分布。第四纪冰期之前,伯乐树具有广泛的地理分布,为伯乐树的遗传变异提供了重要基础,中国南部山区多样化的生境特点一方面促进了居群的遗传变异,另一方面高山的阻挡避免了种群扩散过程中出现奠基者效应,保留了物种大部分的遗传多样性^[23];同时伯乐树作为古第三纪孑遗植物,悠久的进化历史也有利于遗传变异的积累,使得伯乐树在第四纪冰期和冰期后人类活动的双重干扰下,面对原始生境片段化、破碎化、地理居群相互隔离的威胁,仍然保持种内较高水平的遗传多样性。

从种内居群间水平上看,南岭地区的居群遗传多样性水平最高,其次是滇黔桂地区居群,再次是长江中下游地区居群,而南岭山脉以南地区,即广东省境内各伯乐树居群遗传多样性最低,这可能与伯乐树居群的生境特点和进化历史有关。南岭地区主要包括广东和广西,作为热带与亚热带的过渡地区,是我国东南部的物种形成和进化中心,同时也是古热带动植物的避难所和近代东亚温带、亚热带植物的发源地。在中生代三叠纪末期,印支运动发生,南岭地区升出海面成为陆地,长期保持湿热的气候环境,对中生代和新生代的陆生高等植物的孕育和进化起着重要的作用,同时在白垩纪时期受第四纪末冰川的影响小,因而保留和孕育着许多珍稀濒危动植物^[24]。

此外广西大瑶山,以及贵州、福建的丹霞地貌区,因其地形地貌的复杂性,地质历史时期受第四纪冰川的影响较小,加上地处热带常绿阔叶林北部地带,气候温暖湿润,因而也成为不少古老植物的避难所,分布在此的伯乐树居群的遗传多样性水平也较高。广东省境内各居群可能是由南岭地区居群或祖先居群在第四纪冰期之后,由种群快速扩张而来,奠基者效应和瓶颈效应对其影响较大,是导致其遗传多样性低下的一个重要原因^[25]。

3.2 伯乐树的遗传结构

与伯乐树遗传多样性的其他研究相比,如 IS-SR 分子标记 ($G_{ST} = 0.6697$) 和 cpDNA ($G_{ST} = 0.887$)^[2, 6, 8, 9, 19], 本研究结果伯乐树居群间的遗传分化系数 $G_{ST} = 0.7189$ 居中,高于濒危植物平均遗传分化水平 ($G_{ST} = 0.141$)^[26, 27]。这些结果均

表明伯乐树居群间出现了相当高的遗传分化水平,种内遗传变异主要存在于居群间,而不是居群内。

遗传结构是物种的最基本特征之一。首先,从时间因素上看,伯乐树作为古老的孑遗植物,在经历地质历史多次冰川作用后,可能在种群扩散过程中经历了一系列遗传漂变、瓶颈效应和奠基者效应,从而降低了伯乐树居群内的遗传多样性水平。其次,从空间因素上看,伯乐树现有分布区主要位于中国长江以南各省区的山区地带,这些地区山脉众多,如南岭、武夷山、罗霄山和五指山等山脉,地理隔离作用明显,阻碍了基因交流,加剧了居群间的遗传分化,降低了其遗传多样性。最后,从所处原始生境上看,第四纪冰期之后伴随着人类的起源和兴盛,原生境的人为干扰与破坏使得伯乐树野生种群破坏严重,种群数量规模和分布范围缩小,减少了居群间基因交流的机会,同时小种群更易受到系统压力的胁迫和遗传漂变等作用。

本研究通过 STRUCTURE 和 BAPS 分析,将中国伯乐树 24 个居群分为 4 个地理居群组;加之伯乐树的基因流 $N_m = 0.2005$, 表明伯乐树居群间少有基因流发生,加大了伯乐树居群间的遗传分化。影响伯乐树基因流的因素有很多,其中主要决定因素是居群个体散布力。个体散布力又受风和水流的方向、速度以及个体生存时间、气候、地理障碍等因素的制约。伯乐树现代种群呈零散分布,个体散布力较弱,种子属大型种子,且外有光滑的假种皮,不利于动物携带传播和风力传播^[2]。当居群间的个体迁移水平不足以抵消随机遗传漂变和有效居群大小造成的影响时,就会降低居群间的基因流,加剧居群间的遗传分化。同时伯乐树对环境的适应能力,以及居群间的地理距离对基因流影响也较大,导致伯乐树居群间存在较高的遗传分化。

3.3 伯乐树可能的冰期避难所

根据聚类分析、STRUCTURE 及 BAPS 分析,本研究将中国伯乐树居群分为 4 大进化谱系(图 4): 长江中下游、滇黔桂、南岭山脉以南和南岭山脉以北地理居群组。长江中下游地理居群组与南岭山脉以北地理居群组聚成一支,我们推测长江中下游地区各居群可能是由南岭地区的某个或某些居群扩散、迁移形成的,与其亲缘关系较近;长江中下游地区和南岭山脉以南地区的各居群首先是被分别聚成一支的,我们推测在这两个地理区域内各居

群的亲缘关系是较近的, 并可能在冰期之后出现快速的居群扩张过程。

根据本研究的现有分析结果和证据, 综合已有伯乐树谱系地理学研究证据^[2], 我们推测伯乐树在中国地区的扩散中心在云贵高原东部地区, 并和南岭山脉地区一起作为伯乐树历史上的冰期避难所, 对伯乐树的生存和繁衍有着至关重要的意义。

我国生物多样性热点地区包括云贵高原及其邻近地区、南岭山脉地区、横断山脉地区和华中区, 这些地区在环境变化时保持着相对稳定的生境并积累了丰富的遗传多样性, 通常被认为是不同来源生物的交接中间区, 也是潜在的冰期避难所, 而中国伯乐树各居群多分布在上述生物多样性热点地区。长期以来云贵高原及其邻近地区被认为是东南亚植物区系的重要起源中心^[28], 众多研究表明该地区是世界生物多样性热点地区之一^[29], 同时也是众多被子植物和裸子植物的冰期避难所所在地^[20, 30]。王美娜^[2]基于 cpDNA 的单倍型证据, 认为云贵高原东部地区及滇东南很可能是伯乐树在中国的早期冰期避难所, 本研究结果也显示该地区居群遗传多样性较高、遗传结构特殊, 支持以上观点, 认为该地区是中国伯乐树的扩散中心, 由此向北、向东及东南方向进行居群扩散和迁移, 并在第四纪冰期之后伴随着南岭山脉冰期避难所祖先居群的扩张, 也同时向外进行居群扩散, 保持着伯乐树较高的遗传多样性和特殊的遗传结构。

南岭地区在白垩纪时期受第四纪末冰川的影响较小, 因而保留和孕育着许多珍稀濒危动植物, 是古热带动植物的避难所和近代东亚温带、亚热带植物的发源地, 植物区系物种约有 7568 种, 中国特有种比例高达 60%^[24]。本研究结果表明该地区伯乐树各居群遗传多样性水平普遍高于其他居群, 与邻近地区各居群的亲缘关系较近, 故而推测其为伯乐树历史上的另一个冰期避难所。前人对银杉(*Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang)、伞花木(*Eurycorymbus cavaleriei* [Levl.] Rehd. et Hand.-Mazz.) 和华南五针松(*Pinus kwangtungensis* Chun ex Tsiang) 的研究也认为南岭地区的众多山脉, 如八面山、越城岭、都庞岭和萌渚岭等都可能为诸多珍稀濒危植物的冰期避难所^[31-33]。

本研究根据伯乐树各居群的遗传多样性水平、遗传结构性异质性、地理位置特殊性, 以及是否位

于冰期避难所和扩散中心等因素, 综合前人对珍稀植物的保护措施^[34, 35]建议将云南屏边、广西金秀、广东始兴和湖南莽山 4 个居群确定为中国伯乐树的优先保护单元, 对其重点保护。根据本研究相关结果, 我们认为对于伯乐树居群的保护策略应以就地保护为主, 尽可能保护更多居群; 以迁地保护为辅, 进行人工杂交; 优先保护南岭山脉和云贵高原东部地区居群。

致谢: 感谢中国科学院华南植物园物种多样性保育研究组科研人员及学生在实验材料的采集和论文撰写上提供的帮助和指导。

参考文献:

- [1] Lu LL, Boufford DE. Bretschneideraceae[M]// Wu ZY, Raven PH, eds. Flora of China: Vol 8. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2005: 197.
- [2] 王美娜. 孑遗植物伯乐树谱系地理学研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2011: 1-117.
- [3] 傅立国. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 194-195.
- [4] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录[M]. 北京: 中国高等教育出版社, 2004: 336.
- [5] 国务院. 国家重点保护野生植物名录(第一批)[J]. 植物杂志, 1999, 23(5): 4-11.
State Council. National wild plants list for protection (I) [J]. *Plants*, 1999, 23(5): 4-11.
- [6] 彭沙沙, 黄华宏, 童再康, 周厚君, 时剑, 余国民, 骆文坚. 濒危植物伯乐树遗传多样性的初步研究[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 362-367.
Peng SS, Huang HH, Tong ZK, Zhou HJ, Shi J, Yu GM, Luo WJ. Genetic diversity of endangered plant *Bretschneidera sinensis* [J]. *J Plant Genet Resources*, 2011, 12(3): 362-367.
- [7] 王美娜, 乔琦, 张荣京, 胡普炜, 杨国, 陈红锋. 广东南昆山与大岭山孑遗植物伯乐树群落特征比较与谱系地理学研究[J]. 广西植物, 2011, 31(6): 789-794.
Wang MN, Qiao Q, Zhang RJ, Hu PW, Yang G, Chen HF. Studies on the community feature comparison and phylogeography of relic plant *Bretschneidera sinensis* in Nankun and Daling Mountain, Guangdong Province [J]. *Guhaia*, 2011, 31(6): 789-794.
- [8] 林国锋. 濒危植物钟萼木的分子标记及遗传多样性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011: 1-72.
- [9] 徐刚标, 梁艳, 蒋赟, 刘雄盛, 胡尚力, 肖玉菲, 郝博博. 伯乐树种群遗传多样性及遗传结构[J]. 生物多样性, 2013, 21(6): 723-731.
Xu GB, Liang Y, Jiang Y, Liu XS, Hu SL, Xiao YF, Hao BB. Genetic diversity and population structure of *Bretschneidera sinensis*, an endangered species [J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(6): 723-731.

- [10] 梁艳. 南岭地区伯乐树种群遗传多样性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2013: 1–56.
- [11] Hu ZY, Lin L, Deng JF, Wang SH. Genetic diversity and differentiation among populations of *Bretschneidera sinensis* (Bretschneideraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 56(56): 104–110.
- [12] 胡尚力. 伯乐树的谱系地理学研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2014: 1–44.
- [13] 林乐静, 金楚齐, 郑春豪, 周亚美, 周盈. 武夷山地伯乐树种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物研究, 2015, 35(4): 559–563.
Lin LJ, Jin CQ, Zheng CH, Zhou YM, Zhou Y. ISSR analysis on the genetic diversity of relic plant *Bretschneidera sinensis* from Wuyishan region[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2015, 35(4): 559–563.
- [14] 闫丽君. 基于 SSR 标记的伯乐树遗传多样性分析[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2015: 1–49.
- [15] 乔琦, 邢福武, 陈红锋, 钟文超. 广东省南昆山伯乐树群落特征及其保护策略[J]. 西北植物学报, 2010, 30(2): 377–384.
Qiao Q, Xing FW, Chen HF, Zhong WC. Characteristics of community and in situ conservation strategy of *Bretschneidera sinensis* in Nankun Mountain, Guangdong Province[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(2): 377–384.
- [16] Qiao Q, Chen HF, Xing FW, Zhong WC, Wen XY, Hou XG. Pollination ecology of *Bretschneidera sinensis* (Hemsley), a rare and endangered tree in China[J]. *Pak J Bot*, 2012, 44(6): 1897–1903.
- [17] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11–15.
- [18] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- [19] 周天华. 中国特有属植物——马蹄香 (*Saruma henryi* Oliv.) 的分子谱系地理学与遗传多样性研究[D]. 西安: 西北大学, 2010: 1–80.
- [20] 刘美华. 长柄水青冈居群遗传结构和系统地理学研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008: 1–94.
- [21] Charters YM, Robertson A, Wilkinson MJ, Ramsay G. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers[J]. *TAG Theor Appl Genet*, 1996, 92(3–4): 442–447.
- [22] Mattioni C, Casasoli M, Gonzalez M, Ipinza R, Villani F. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species[J]. *TAG Theor Appl Genet*, 2002, 104(6–7): 1064–1070.
- [23] Hewitt GM. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation [J]. *Bot J Linn Soc*, 1996, 58(3): 247–276.
- [24] 陈冬梅, 康宏樟, 刘春江. 中国大陆第四纪冰期潜在植物避难所研究进展[J]. 植物研究, 2011, 31(5): 623–632.
Chen DM, Kang HZ, Liu CJ. An overview on the potential Quaternary glacial refugia of plants in China mainland[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2011, 31(5): 623–632.
- [25] 沈浪, 陈小勇, 李媛媛. 生物冰期避难所与冰期后的重新扩散[J]. 生态学报, 2002, 2(11): 1983–1990.
Shen L, Chen XY, Li YY. Glacial refugia and postglacial recolonization patterns of organism[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(11): 1983–1990.
- [26] Hamrick JL, Godt MJW. Allozyme diversity in plant species[C]//Brown AHD ed. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland: Sinauer Associates. Inc., 1990: 43–63.
- [27] Petit RJ, Dumitil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations[J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(3): 689–701.
- [28] Wang WT. On some distribution patterns and some migration routes found in the eastern Asiatic region[J]. *Acta Phytotaxon Sin*, 1992, 30(1): 1–24.
- [29] Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GA, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities [J]. *Nature*, 2001, 403: 853–858.
- [30] 龚维. 孑遗植物银杏的分子亲缘地理学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007: 1–169.
- [31] Wang J, Gao P, Huang HW. Refugia within refugia: the case study of a canopy tree (*Eurycorymbus cavaleriei*) in subtropical China[J]. *J Biogeogr*, 2009, 36(11): 2156–2164.
- [32] Ying J. Species diversity and distribution pattern of seed plants in China[J]. *Chin Biodivers*, 2000, 9(4): 393–398.
- [33] Tian S, Pujol JL, Wang HW, Ge S, Zhang ZY. Molecular evidence for glacial expansion and interglacial retreat during quaternary climatic changes in a montane temperate pine (*Pinus kwangtungensis* Chun ex Tsiang) in southern China[J]. *Plant Syst Evol*, 2010, 284(3–4): 219–229.
- [34] 唐春燕, 宋贤利, 洪宝莹, 郭菲力, 曾秀桦, 易綺斐, 邢福武. 澳门九澳山海滨群落特征分析与生态恢复建议[J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 44–52.
Tang CY, Song XL, Hong BY, Guo FL, Zeng XH, Yi QF, Xing FW. Characteristics of the coastal plant community and ecological restoration proposal on Ka Ho Hill, Macau [J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(1): 44–52.
- [35] 陈龙涛, 石晓东, 高润梅. 山西陵川南方红豆杉群落种间联结与生态位特征研究[J]. 植物科学学报, 2016, 34(4): 521–529.
Chen LT, Shi XD, Gao RM. Interspecific association and niche characteristics of *Taxus chinensis* var. *mairei* communities in Lingchuan, Shanxi[J]. *Plant Science Journal*, 2016, 34(4): 521–529.