

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.04.002

中国沙棘和云南沙棘的遗传分化及遗传多样性

王天翼, 徐悦, 王罗云, 张建国, 曾艳飞*

(中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要: [目的] 探究中国沙棘和云南沙棘的遗传分化, 明确二者分布区的地理边界, 并评估其遗传多样性情况。 [方法] 利用 18 个简单重复序列 (SSR) 标记对 32 个中国沙棘和云南沙棘种群进行遗传变异检测, 结合形态学和地理分布, 利用系统发育分析和遗传结构分析鉴定种群分组情况, 计算种群间遗传分化系数 (F_{ST}), 开展分子方差分析, 计算遗传多样性参数 (等位基因数 (N_A)、有效等位基因数 (N_E)、观测杂合度 (H_O)、期望杂合度 (H_E) 和近交系数 (F_{IS}))。 [结果] 中国沙棘的遗传多样性高于云南沙棘, 中国沙棘种群间的遗传分化系数低于云南沙棘。 AMOVA 分析显示: 种群间遗传变异所占比例中国沙棘 (25.5%) 低于云南沙棘 (36.7%), 表明来自不同地理种群的中国沙棘分化程度低、遗传变异更多的来源于种群内不同个体间。系统发育树分析显示: 中国沙棘个体主要聚为一大支, 而云南沙棘存在多个差异较大的分支, 中国沙棘和四川地区的云南沙棘关系很近。遗传结构分析将所有中国沙棘和云南沙棘个体分为 2 组, 2 亚种间邻近种群存在杂交, 尤其是位于四川北部的红原、松潘种群。 [结论] 中国沙棘相较于云南沙棘有更高的遗传多样性和较低的种群间分化; 推测 2 亚种的分布边界位于四川北部的红原县、松潘县地区一带。

关键词: 中国沙棘; 云南沙棘; SSR; 遗传分化; 遗传多样性

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)04-0013-09

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* Linn.), 又名醋柳、酸刺、黑刺等, 属胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属 (*Hippophae*), 是二倍体 ($2n=24$), 落叶灌木或小乔木, 雌雄异株, 风媒传粉; 主要分布于欧亚大陆, 集中在温带和寒温带地区, 生态幅极广^[1-4]。沙棘具有很高的营养价值和经济价值, 在开发保健食品、药品和化妆品上有着独特的作用, 还是很多偏远地区脱贫致富的经济来源。更重要的是, 沙棘具有很高的生态价值, 被广泛应用在治理荒漠化、退耕还林、植被绿化等方面^[4-5]。

沙棘共包括了 9 个亚种^[2-3], 起源于青藏高原, 后多次扩散至亚欧大陆其他地区^[6], 其中, 中国沙棘 (*H. rhamnoides* subsp. *sinensis*) 和云南沙

棘 (*H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*) 是我国特有的沙棘亚种。中国沙棘叶常近对生, 成狭披针形或矩圆披针形, 叶背面银白色、被鳞片, 从西南到东北都有自然种群分布^[7], 同时它也是我国栽培和种植历史最悠久的一个亚种^[8]。云南沙棘叶互生, 基部最宽, 常为圆形或有时楔形, 叶背面灰褐色、被锈色鳞片, 其分布范围相对狭窄, 多分布于西藏、四川和云南的交界地带^[7]。依据国家植物标本资源库 (<http://www.cvh.ac.cn/>)、Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <https://www.gbif.org/>)、国家资源标本平台 (<http://nsii.org.cn/2017/>) 和相关沙棘研究文献等资料记载的沙棘分布点, 中国沙棘和云南沙棘在地理上有分类存在疑问的区域, 主

收稿日期: 2020-11-15 修回日期: 2021-03-17

基金项目: 中国林业科学院基本科研业务费专项 (CAFYBB2019ZY004)

作者简介: 王天翼, 在读硕士研究生。主要研究方向: 植物系统进化。电话: 16631200566。Email: wangty02@163.com

* 通讯作者: 曾艳飞, 副研究员, 硕士生导师。主要研究方向: 植物系统进化。电话: 13811833021。Email: zengyf@caf.ac.cn

要集中在四川省北部和中西部。中国沙棘和云南沙棘形态相似,并且具有不完全谱系分选,亲缘关系较近,区分难度较大^[8]。判定该区域种群基因流的变化、种群间的分界线,有利于明确遗传扩散适应机制^[9]。目前,有关中国沙棘和云南沙棘谱系地理的研究文献以及标本资源库对于四川省北部和中西部沙棘的种类归属问题存在一定的分歧^[8,10-11]。

本研究中,笔者利用18个SSR标记对来自32个自然种群的352个中国沙棘和云南沙棘个体和沙棘属其他种和亚种的75个个体进行遗传变异分析,以期探讨以下问题:(1)中国沙棘和云南沙棘是否存在明显的遗传分化?二者的物理分界线在哪?(2)中国沙棘和云南沙棘的遗传多样性分布如何?

1 材料与方法

1.1 样本采集

从中国沙棘和云南沙棘的典型分布地区和分类存疑地区采集了32个自然种群,共352个个体。因沙棘存在克隆繁殖,为了避免取到同一基因型个体,采集时不同样品间至少间隔200 m。对所采集的个体进行形态学观察以便初步定种,并记录定位(表1)。为了明确中国沙棘和云南沙棘的系统发育关系,还收集了沙棘属其他种及亚种分别5~10个共75个个体用于分析(表1),包括蒙古沙棘(*H. rhamnoides* subsp. *mongolica*)、溪生沙棘(*H. rhamnoides* subsp. *fluviatilis*)、高加索沙棘(*H. rhamnoides* subsp. *caucasica*)、中亚沙棘(*H. rhamnoides* subsp. *turkestanica*)、海滨沙棘(*H. rhamnoides* subsp. *rhamnoides*)、西藏沙棘(*H. tibetana*)、肋果沙棘(*H. neurocarpa*)、棱果沙棘(*H. goniocarpa*)、江孜沙棘(*H. gyantsensis*)、柳叶沙棘(*H. salicifolia*)。所有收集到的叶片均用变色硅胶干燥保存。

1.2 DNA提取和SSR基因型检测

叶片总DNA的提取采用CTAB植物基因组DNA快速提取试剂盒(北京艾德莱生物公司)。从沙棘基因组和转录组开发的SSR分子标记^[12]中选取18对对所有个体进行PCR扩增,反应总体积为20 μ L,反应体系和反应程序参照王罗云等^[13]的工作进行。

用ABI 3730测序仪(美国生命技术公司)对PCR产物分析,内标选择Liz500,结果经由软件

Genemapper 4.0(美国生命技术公司)分析,对于SSR基因型完全一致的潜在克隆株个体仅保留一份样品,所得到数据均以大果沙棘品种“向阳”为阳性对照。

1.3 系统发育分析

两两样品间的遗传距离由软件MSA 4.05^[14]计算,再用Phylip 3.695^[15]软件中的Neighbor程序对所有沙棘个体以及中国沙棘和云南沙棘分别构建系统发育树,自展值设置成1 000次。

1.4 遗传结构分析

利用Structure 2.3^[16]软件确定所采集中国沙棘和云南沙棘个体的遗传分组情况。采用混合模型和等位基因频率关联模型,分组值 K 设置为1~10,每个 K 值重复计算10次,每次运行100 000次Burnin和1 000 000次迭代^[13]。将结果上传到Structure Harvester(<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>)中,根据 $\ln P(D)$ 和 ΔK 最大原则^[17]选择合适的 K 值,再通过Distruct 1.1^[18]将结果可视化。

1.5 遗传多样性和遗传分化分析

利用软件GenAlEx 6.503^[19],计算中国沙棘和云南沙棘种群的遗传多样性参数,包括等位基因个数 N_A 、有效等位基因个数 N_E 、观测杂合度 H_O 、期望杂合度 H_E 和近交系数 F_{IS} 。利用MSA 4.05^[14]计算遗传分化系数 F_{ST} ,并进行分子方差分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)。

2 结果

2.1 中国沙棘和云南沙棘的系统发育关系及遗传结构

基于SSR基因型构建的沙棘属的5个种和7个亚种的系统发育树结果(图1A)显示:所有的中国沙棘都聚为一大支,而云南沙棘个体主要聚为4支;除一支及少量个体与中国沙棘聚在一起外,其他3支都和中国沙棘距离较远,其中,1支由12个云南沙棘个体(图1A虚线部分)组成的分支与沙棘属的其他4个种——西藏沙棘、肋果沙棘、江孜沙棘和柳叶沙棘聚在一起,这12个个体包括来自BS种群1个、XZD种群1个、XJ种群1个、BX种群7个、WL种群2个。中国沙棘和云南沙棘的个体单独构建的系统发育树(图1B)显示:除6个云南沙棘个体(LX种群2个、LTB种群2个、CY种群1个、BS种群1个)与中国沙棘种群交叉聚在一起外,其余个体明显地分为

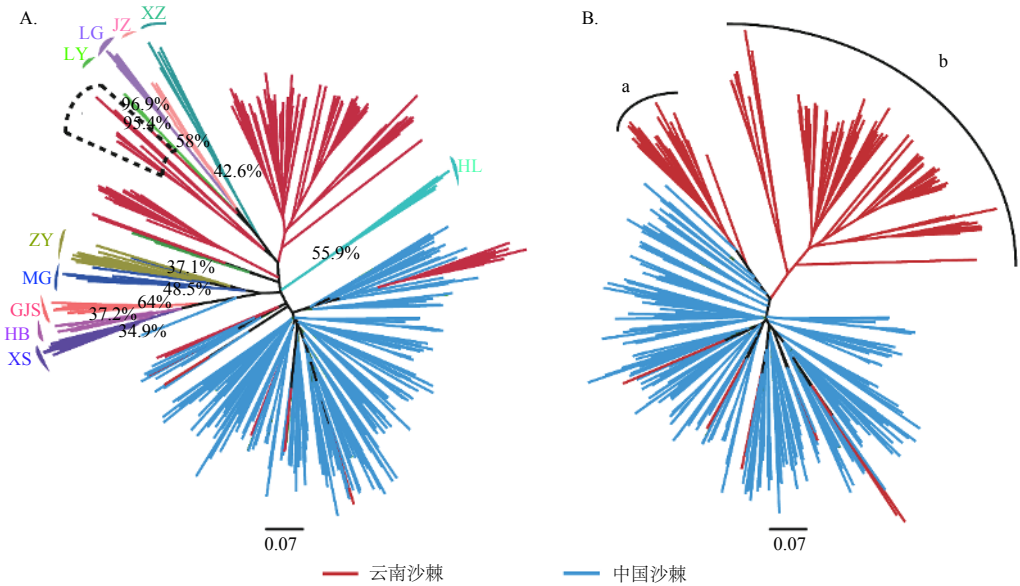
表1 沙棘种群采样信息

Table 1 Sampling information of sea buckthorn populations

种群编号 Population code	采样地点 Location	纬度(N) Latitude	经度(E) Longitude	样本数量 Sample number
中国沙棘 (<i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>sinensis</i>)				
CFA	内蒙古自治区赤峰市	42°25'12"	119°45'36"	20
BAH	内蒙古自治区敖汉旗	42°18'51"	119°54'01"	6
WC	河北省围场县	41°58'48"	117°41'24"	20
SY	河北省围场县	41°53'24"	117°05'23"	19
DaBao	河北省蔚县	40°00'04"	115°00'22"	20
YY	山西省左云县	40°04'48"	112°51'36"	20
ZJW	山西省大同市云冈区	40°06'50"	113°01'06"	20
QS	山西省沁水县	35°28'41"	112°01'43"	5
WQ	陕西省吴起县	36°55'04"	108°12'25"	12
XY	陕西省旬邑县	35°21'19"	108°41'46"	8
TW	甘肃省通渭县	35°18'33"	105°26'31"	3
ZhN	甘肃省卓尼县	34°39'17"	103°27'49"	10
LinX	甘肃省积石山县	35°39'43"	102°54'08"	10
QL	青海省祁连县	38°05'27"	100°21'39"	11
GLT	四川省松潘县	32°55'13"	103°24'30"	5
QY	四川省松潘县	32°33'08"	103°37'25"	10
HY	四川省红原县	32°52'19"	102°35'47"	10
MWS	四川省红原县	32°55'00"	102°37'42"	4
云南沙棘 (<i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>yunnanensis</i>)				
LX	四川省理县	31°30'56"	102°55'42"	17
SJS	四川省红原县	31°54'04"	102°38'37"	12
WL	四川省汶川县	30°54'43"	103°01'27"	12
BX	四川省宝兴县	30°40'56"	102°45'00"	10
XJ	四川省小金县	30°58'47"	102°18'15"	8
DB	四川省丹巴县	30°44'12"	101°44'29"	5
KD	四川省康定县	30°02'42"	101°33'47"	6
LTB	四川省理塘县	29°46'07"	100°22'11"	20
BS	西藏自治区八宿县	29°30'20"	96°44'22"	8
PM	西藏自治区波密县	29°52'12"	95°46'12"	4
ML	西藏自治区米林县	29°13'12"	94°13'12"	6
LZ	西藏自治区工布江达县	29°57'18"	93°40'39"	18
CY	西藏自治区察隅县	29°19'21"	97°09'58"	3
XZD	云南省香格里拉县	27°47'34"	99°40'57"	10
蒙古沙棘 (<i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>mongolica</i>)				
MG	中国新疆维吾尔自治区哈巴河县、青河县、吉木乃县、布尔津县等			8
溪生沙棘 (<i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>fluviatilis</i>)				
XS	瑞士苏黎世、法国弗莱堡、德国汉堡等			10
高加索沙棘 (<i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>caucasica</i>)				
GJS	各地混合种子播种			10
中亚沙棘 (<i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>turkestanica</i>)				
ZY	中国新疆乌恰县、吉根乡等			10
海滨沙棘 (<i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>rhamnoides</i>)				
HB	丹麦、罗马尼亚等			8
西藏沙棘 (<i>H. tibetana</i>)				
XZ	西藏自治区米拉山口、甘肃省天祝县			6
肋果沙棘 (<i>H. neurocarpa</i>)				
LG	中国青海省祁连县、四川省红原县			6
棱果沙棘 (<i>H. goniocarpa</i>)				
HL	中国青海省祁连县			6
江孜沙棘 (<i>H. gyantsensis</i>)				
JZ	中国西藏自治区工布江达县			6
柳叶沙棘 (<i>H. salicifolia</i>)				
LY	中国西藏自治区错那县			5

2部分,各分支支持率大都不高(小于50%);云南沙棘个体可分为a、b2支,其中,a支为种群的个体与中国沙棘聚在一起,b支为西藏、云南和四

川中南部与中国沙棘距离较远;中国沙棘各分支支长较短,差异不明显,云南沙棘各分支支长较长,遗传距离较远。



注: A: 沙棘的5个种和7个亚种的系统发育树; B: 中国沙棘和云南沙棘的系统发育树(a. 分界线附近种群的个体, b. 西藏、云南和四川中南部个体)。百分比为节点支持率;种群编号同表1。

Notes: A: Phylogenetic tree of five species and seven subspecies of *Hippophae*; B: Phylogenetic tree of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis* (a. Individuals from populations near distribution boundary. b. Individuals from Xizang, Yunnan and southern central of Sichuan.). The percentage represents the node supporting probability of each taxa; population codes see Table 1.

图1 基于18个SSR标记的沙棘个体系统发育树。

Fig. 1 Individual phylogenetic trees of *Hippophae* based on 18 SSR makers.

利用 Structure 2.3^[16] 软件,基于中国沙棘和云南沙棘个体 SSR 基因型的分组分析显示: $\ln P(D)$ 在 $K=2$ 时迅速增高, $K>2$ 后趋于平缓(图 2A); ΔK 在 $K=2$ 时有明显峰值(图 2B)。因此,所有个体分2组最合适,对应与按初步形态分为中国沙棘和云南沙棘2个亚种(图 2C)。位于四川的 MWS 和 QY 2个种群的大部分个体表现为这2组的中间基因型(图 2C),因此,后续分析将把 MWS、QY 作为中间型种群。

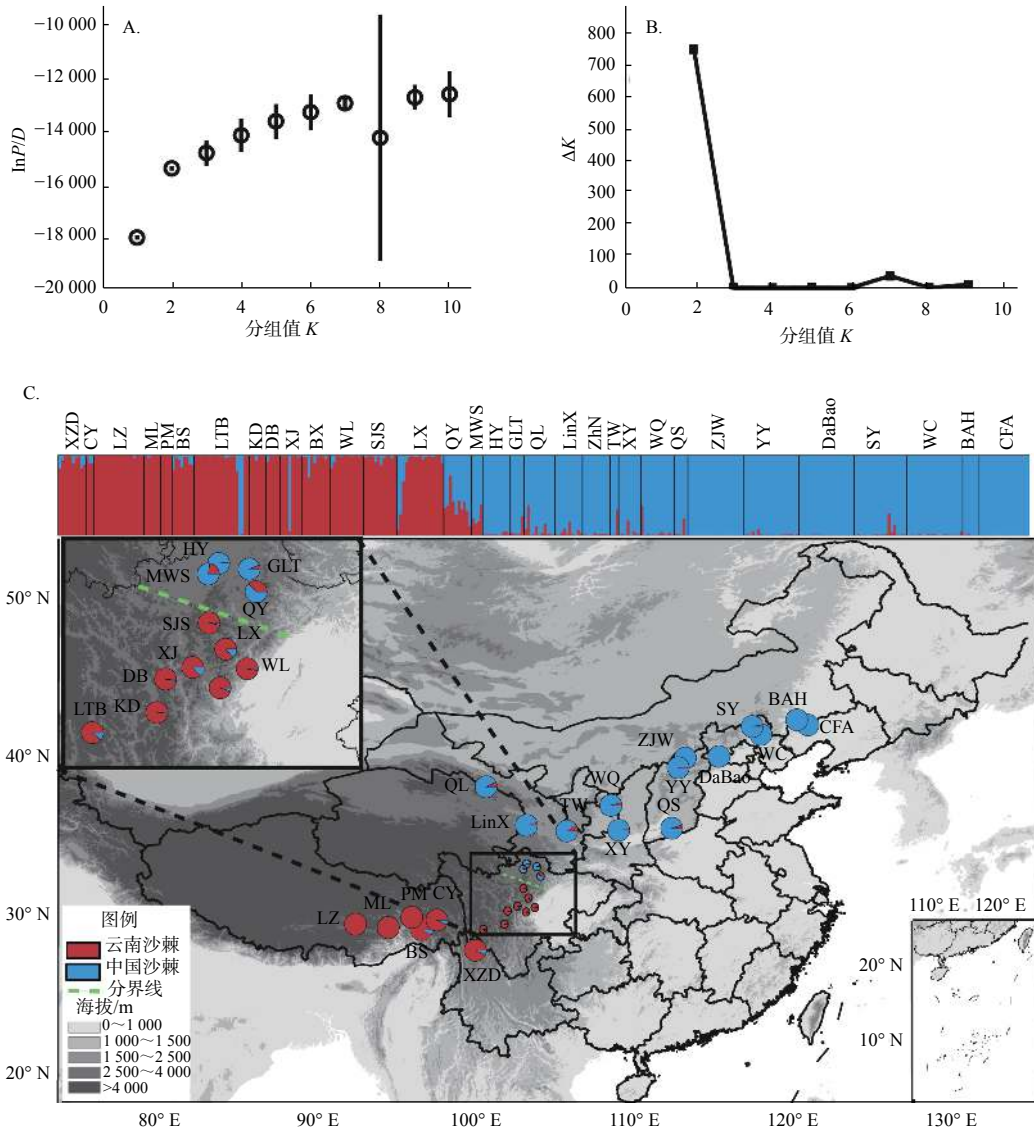
2.2 中国沙棘和云南沙棘的遗传多样性

基于18个SSR位点的中国沙棘遗传多样性参数(表2)表明: N_A 为1.7~4.9(平均3.5), N_E 为1.4~2.7(平均2.3), H_O 为0.213~0.528(平均0.402), H_E 为0.266~0.539(平均0.462)。基于18个SSR位点的云南沙棘遗传多样性参数如下(表2)表明: N_A 为1.4~4.2(平均2.7)、 N_E 为1.3~2.4(平均1.8)、 H_O 为0.056~0.331(平均0.202)、 H_E 为0.127~0.490(平均0.334)。中国沙棘和云南沙棘中 H_O 最高

的种群分别是 YY 和 KD, 最低的种群分别为 TW 和 PM。中国沙棘的 N_A 、 N_E 、 H_O 、 H_E 均值均高于云南沙棘。

2.3 中国沙棘和云南沙棘的遗传分化

基于18对SSR标记,中国沙棘两两种群间的 F_{ST} 为0.026~0.286, 分化程度最低的为种群 CFA 和 WC, 分化程度最高的为种群 TW 和 HY; 云南沙棘两两种群间的 F_{ST} 为0.069~0.539, 分化程度最低的为种群 LX 和 SJS, 分化程度最高的为种群 LZ 和 SJS; 云南沙棘的 F_{ST} 值、 F_{IS} 值普遍高于中国沙棘(表2、3)。AMOVA 分析显示(表4)显示: 中国沙棘和云南沙棘亚种间遗传变异占比为23.7%, 亚种内不同种群间占23.3%, 种群内个体间占53.0%。中国沙棘25.5%的遗传变异来自种群间, 74.5%的遗传变异来自种群内个体间; 云南沙棘种群36.7%的遗传变异来自种群间, 63.3%的遗传变异来自种群内个体间。



注: (A) 不同 K 值对应的 $\ln P(D)$; (B) 不同 K 值对应的 ΔK ; (C) 种群的遗传分组结果和地理分布示意图。种群编号同表 1。该图基于审图号为 GS (2019)1822 的标准地图制作。

Notes: (A) The $\ln P(D)$ corresponding to different K value; (B) ΔK of each K value; (C) Population structure and the geographic distribution of populations. See Table 1 for details of each population code. This map is based on the standard map of GS (2019)1822.

图 2 中国沙棘和云南沙棘种群的遗传分组结果

Fig. 2 Population structure of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*.

3 讨论

3.1 中国沙棘和云南沙棘的“边界线”

依据标本、文献资料的记载,在四川省部分地区,中国沙棘和云南沙棘的分类存在争议。本研究基于 18 个 SSR 位点的基因型,系统发育树和 Structure 2.3^[16] 软件分组结果都显示,中国沙棘和云南沙棘可分成明显的 2 组,种群 MWS 和 QY 的大部分个体表现为 2 组间杂交。这 2 个种群分别位于四川北部的红原县和松潘县,该区域北侧种群的遗传组成

中含更多的中国沙棘遗传成份,南侧种群的遗传组成中含更多的云南沙棘遗传成份,因此,推测该地区为中国沙棘和云南沙棘的分布边界带。Wang 等^[8] 利用叶绿体片段序列研究中国沙棘的空间遗传分布时,发现重叠分布区的中国沙棘的 2 个单倍型也存在于云南沙棘中,并且单倍型在若尔盖盆地有明显的分界。这与本研究确定的分布边界带区域相符,这一结果可为沙棘的物种鉴定分类提供初步依据。要进一步确定分界线的地理位置,还需要更多的数据,如形态学数据、地形数据、气候数据等。

表2 本研究分析的30个沙棘种群的遗传多样性参数
Table 2 The genetic diversity of 30 sea buckthorn populations

中国沙棘 <i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>sinensis</i>						云南沙棘 <i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>yunnanensis</i>					
种群编号 Population code	N_A	N_E	H_O	H_E	F_{IS}	种群编号 Population code	N_A	N_E	H_O	H_E	F_{IS}
CFA	4.6	2.4	0.442	0.498	0.055	LX	4.2	2.4	0.323	0.490	0.292
BAH	2.9	2.1	0.417	0.432	0.008	SJS	3.1	1.9	0.278	0.403	0.256
WC	4.9	2.6	0.458	0.539	0.149	WL	3.3	2.1	0.242	0.413	0.394
SY	4.7	2.7	0.360	0.538	0.265	BX	2.9	2.0	0.118	0.403	0.707
DaBao	3.3	2.2	0.517	0.469	-0.107	XJ	2.9	1.9	0.237	0.416	0.460
YY	3.8	2.3	0.528	0.476	-0.114	DB	2.3	1.8	0.195	0.285	0.248
ZJW	2.9	2.2	0.436	0.456	0.070	KD	2.4	1.9	0.331	0.387	0.088
QS	2.4	1.9	0.306	0.386	0.181	LTB	3.9	2.1	0.318	0.460	0.318
WQ	3.8	2.4	0.342	0.499	0.316	BS	2.3	1.7	0.176	0.300	0.406
XY	2.4	1.9	0.237	0.401	0.393	PM	1.4	1.3	0.056	0.127	0.449
TW	1.7	1.4	0.213	0.266	0.125	ML	2.0	1.4	0.094	0.227	0.418
ZhN	4.1	2.6	0.415	0.507	0.183	LZ	2.4	1.5	0.088	0.207	0.561
LinX	3.8	2.5	0.418	0.504	0.149	CY	1.6	1.5	0.130	0.253	0.518
QL	3.4	2.3	0.375	0.454	0.104	XZD	2.8	1.8	0.236	0.300	0.254
GLT	3.3	2.4	0.522	0.487	-0.112						
HY	3.6	2.2	0.444	0.487	0.075						
平均值 Mean	3.5	2.3	0.402	0.462	0.100	平均值 Mean	2.7	1.8	0.202	0.334	0.378

注：参数计算不包含中间型种群MWS和QY。

Note: Genetic intermediate populations named MWS and QY were not included in this analysis.

表3 中国沙棘（对角线左下方）和云南沙棘（对角线右上方）亚种内不同种群间遗传分化系数（ F_{ST} ）

Table 3 Genetic differentiation coefficients (F_{ST}) between populations within *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* (below diagonal) and within *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis* (above diagonal), respectively.

种群编号 Population code		SJS	WL	BX	XJ	DB	KD	LTB	BS	PM	ML	LZ	CY	XZD		
BAH	0.031*		0.069**	0.173**	0.370**	0.153**	0.227**	0.226**	0.218**	0.335**	0.390**	0.383**	0.450**	0.315**	0.360**	LX
WC	0.026**	0.076**		0.244**	0.417**	0.205**	0.330**	0.312**	0.302**	0.416**	0.491**	0.474**	0.539**	0.404**	0.454**	SJS
SY	0.037**	0.032	0.064**		0.284**	0.147**	0.137*	0.198**	0.168**	0.291**	0.394**	0.378**	0.452**	0.257*	0.364**	WL
DaBao	0.088**	0.105**	0.095**	0.102**		0.323**	0.346*	0.340**	0.324**	0.345**	0.458**	0.425**	0.514**	0.314*	0.458**	BX
YY	0.080**	0.140**	0.092**	0.088**	0.126**		-0.005	0.011	0.122**	0.284**	0.387**	0.360**	0.436**	0.250*	0.353**	XJ
ZJW	0.085**	0.136**	0.056**	0.110**	0.115**	0.132**		0.071	0.131**	0.277**	0.528**	0.457*	0.528**	0.303*	0.447**	DB
QS	0.093**	0.109*	0.089**	0.058**	0.130**	0.160**	0.181**		0.017	0.239**	0.371**	0.301**	0.381**	0.254*	0.269**	KD
WQ	0.092**	0.075**	0.061**	0.093**	0.114**	0.130**	0.088**	0.059*		0.225*	0.337**	0.301**	0.369**	0.222**	0.214**	LTB
XY	0.126**	0.123**	0.125**	0.086**	0.167**	0.143**	0.202**	0.051	0.060**		0.286**	0.219**	0.308*	-0.051	0.423**	BS
TW	0.196**	0.197**	0.190**	0.142**	0.271**	0.239**	0.271**	0.089	0.177**	-0.009		0.081	0.064	0.316*	0.452**	PM
ZhN	0.104**	0.076**	0.090**	0.044**	0.132**	0.142**	0.120**	0.047*	0.030*	0.077**	0.125*		0.087*	0.257*	0.387**	ML
LinX	0.117**	0.097**	0.088**	0.085**	0.181**	0.167**	0.144**	0.049	0.052**	0.074**	0.073	0.017		0.345**	0.425**	LZ
QL	0.159**	0.174**	0.150**	0.116**	0.207**	0.178**	0.195**	0.057*	0.110**	0.141**	0.153*	0.037	0.100**		0.372**	CY
GLT	0.108**	0.131**	0.099**	0.086**	0.146**	0.175**	0.134*	0.179*	0.102**	0.150**	0.227*	0.066**	0.125**	0.141**		
HY	0.121**	0.118**	0.150**	0.120**	0.190**	0.168**	0.193**	0.213**	0.155**	0.154**	0.286**	0.126**	0.148**	0.165**	0.117**	
CFA	BAH	WC	SY	DaBao	YY	ZJW	QS	WQ	XY	TW	ZhN	LinX	QL	GLT		

注：参数计算不包含中间型种群MWS和QY，*表示 $0.01 < P \leq 0.05$ ，**表示 $P \leq 0.01$ 。

Notes: Genetic intermediate populations named MWS and QY were not included in this analysis. *represents $0.01 < P \leq 0.05$, ** represents $P \leq 0.01$.

表4 中国沙棘和云南沙棘基于 SSR 基因型的 AMOVA 分析

Table 4 AMOVA analysis based on SSR genotypes of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	方差分量 Variance component	方差分量比 Percentage of variance/%
中国沙棘与云南沙棘 <i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>sinensis</i> and <i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>yunnanensis</i>					
亚种间 Among taxa	1	931.4	931.4	5.2	23.7
亚种内种群间 Among populations within taxa	28	1 918.9	68.5	5.1	23.3
种群内个体间 Among individuals within populations	308	3 579.3	11.6	11.6	53.0
总计 Total	337	6 429.6		21.9	100.0
中国沙棘 <i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>sinensis</i>					
种群间 Among populations	15	886.3	59.1	3.9	25.5
种群内个体间 Among individuals within populations	183	2 094.2	11.4	11.4	74.5
总计 Total	198	2 980.5		15.3	100.0
云南沙棘 <i>H. rhamnoides</i> subsp. <i>yunnanensis</i>					
种群间 Among populations	13	1 033.4	79.5	6.9	36.7
种群内个体间 Among individuals within populations	125	1 490.3	11.9	11.9	63.3
总计 Total	138	2 523.7		18.8	100.0

注: 参数计算不包含中间型种群MWS和QY。

Note: Genetic intermediate populations named MWS and QY were not included in this analysis.

中国沙棘和云南沙棘的系统发育树中, 分支支持率低, 可能存在种间杂交; 同一亚种内部各分支支持率大多不高, 同一地理种群个体并不能完全聚在一起, 说明地理种群间存在基因流; Structure 结果也表明, 亚种间有基因渐渗现象, 这与前人研究结果一致^[6, 11]。中国沙棘与云南沙棘亲缘关系较近, 亚种间和种群间可能存在基因交流。但要进一步明确基因交流的程度, 还需要更多的 SSR 位点等遗传信息的支持, 以及覆盖范围更广的样品收集。

3.2 中国沙棘和云南沙棘的遗传分化和遗传多样性

孙坤等^[20]利用 ISSR 标记研究了不同海拔中国沙棘的遗传变异情况, 发现产生遗传分化的主要原因可能是基因流受限。本研究中, 依据 AMOVA 和遗传分化系数, 发现云南沙棘的遗传分化程度高于中国沙棘, 造成这一结果的主要原因可能是云南沙棘采集自四川、云南、西藏等地形复杂地区, 复杂的地形和气候使种群间的基因交流受限。另一个可能是, 某些地区的云南沙棘种群可能与某种沙棘, 如肋果沙棘^[2], 存在种间杂交, 杂交后代的存在或杂交导致的基因渐渗使得这些种群与其他地区的云南沙棘种群的遗传差异升高。

沙棘被推测为起源于青藏高原地区, 青藏高原的隆升和第三纪气候影响了它的分布范围和多样性, 而后扩散到欧洲和中国其他地区^[11, 21]。中国沙棘在我国境内分布广, 从西藏、云南到辽宁、内蒙

均有自然种群分布, 生境差异较大。通常分布范围广的物种有着更高的遗传多样性, 而遗传多样性越高, 越能为其适应当地环境提供有力支持^[22-24]。本研究中, 中国沙棘的各项遗传多样性参数均高于云南沙棘, 代表中国沙棘的遗传多样性高于云南沙棘种群, 这与前人研究结论一致^[8, 13], 这可能是由于中国沙棘相较于云南沙棘分布范围广。

4 结论

本研究探讨了中国沙棘和云南沙棘的系统发育关系, 发现中国沙棘的遗传多样性高于云南沙棘, 与前者更广泛的分布范围有关; 云南沙棘种群的遗传分化程度高于中国沙棘种群, 推测是复杂的高山地形限制了云南沙棘种群间的基因交流, 或区域性种间杂交渐渗提高了不同地理种群间的差异; 确定了中国沙棘和云南沙棘的分布边界位于四川北部的红原县、松潘县一带。本工作为中国沙棘和云南沙棘遗传资源的保护和利用提供了重要的基础。

参考文献:

- [1] 廉永善, 陈学林, 于倬德, 等. 沙棘属植物起源的研究[J]. 沙棘, 1997, 10(2): 1-7.
- [2] Bartish I V, Jeppsson N, Nybom H, et al. Phylogeny of *Hippophae* (Elaeagnaceae) inferred from parsimony analysis of chloroplast DNA and morphology[J]. Systematic Botany, 2002, 27(1): 41-54.

- [3] Sun K, Chen X, Ma R, *et al.* Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. (Elaeagnaceae) based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2002, 235(1): 121-134.
- [4] 卢顺光, 卢 健, 温秀凤. 沙棘植物资源分布与营养学应用综述[J]. *中国水土保持*, 2019 (7): 45-49.
- [5] 陈学林, 马瑞君, 孙 坤, 等. 中国沙棘属种质资源及其生境类型的研究[J]. *西北植物学报*, 2003, 23 (3): 451-455.
- [6] Jia D, Abbott R J, Liu T, *et al.* Out of the Qinghai-Tibet Plateau: evidence for the origin and dispersal of Eurasian temperate plants from a phylogeographic study of *Hippophaë rhamnoides* (Elaeagnaceae)[J]. *New Phytologist*, 2012, 194(4): 1123-1133.
- [7] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [8] Wang H, Liu H, Yang M, *et al.* Phylogeographic study of Chinese seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi) reveals two distinct haplotype groups and multiple microrefugia on the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Ecology and Evolution*, 2014, 4(22): 4370-4379.
- [9] 郭亚龙. 拟南芥及其近缘种的适应性进化研究[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49 (4): 320-326.
- [10] 赵春芳, 陈国娟, 王莘华, 等. 利用RAPD标记分析卧龙自然保护区不同海拔沙棘种群的遗传变异[J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13 (6): 753-758.
- [11] 马玉花, 冶贵生, 向前胜, 等. 基于ITS序列探讨沙棘属植物的系统发育关系[J]. *应用生态学报*, 2014, 25 (10): 2985-2990.
- [12] 李珊珊, 曾艳飞, 何彩云, 等. 基于沙棘转录组序列开发EST-SSR分子标记[J]. *林业科学研究*, 2017, 30 (1): 69-74.
- [13] 王罗云, 何彩云, 罗红梅, 等. 沙棘7个亚种与26个重要品种的遗传多样性[J]. *浙江农林大学学报*, 2019, 36 (4): 670-677.
- [14] Dieringer D, Schlötterer C. Microsatellite analyser (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3(1): 167-169.
- [15] Blanquart F, Kaltz O, Nuismer S L, *et al.* A practical guide to measuring local adaptation[J]. *Ecology Letters*, 2013, 16(9): 1195-1205.
- [16] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155(2): 945-959.
- [17] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [18] Rosenberg N A. DISTRICT: a program for the graphical display of population structure[J]. *Molecular Ecology Resource*, 2004, 4(1): 137-138.
- [19] Peakall R, Smouse P E. GenALEX 6: Genetic analysis in excel[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 6(1): 288-295.
- [20] 孙 坤, 王瑞雪, 陈 纹, 等. 山西五台山不同海拔中国沙棘居群的遗传变异[J]. *西北师范大学学报: 自然科学版*, 2013, 49 (2): 77-81.
- [21] Jia D R, Bartish I V. Climatic changes and orogeneses in the late Miocene of Eurasia: The main triggers of an expansion at a continental scale[J]? *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1400. doi: 10.3389/fpls.2018.01400.
- [22] Manel S, Joost S, Epperson B K, *et al.* Perspectives on the use of landscape genetics to detect genetic adaptive variation in the field[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(17): 3760-3772.
- [23] Hoban S, Kelley J L, Lotterhos K E, *et al.* Finding the genomic basis of local adaptation: Pitfalls, Practical Solutions, and Future Directions[J]. *The American Naturalist* October, 2016, 188(4): 379-397.
- [24] 孙 坤, 陈 纹, 马瑞君, 等. 子午岭中国沙棘亚居群的遗传多样性研究[J]. *兰州大学学报: 自然科学版*, 2004, 40 (3): 77-80.

Genetic Differentiation and Genetic Diversity of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*

WANG Tian-yi, XU Yue, WANG Luo-yun, ZHANG Jian-guo, ZENG Yan-fei

(Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the genetic differentiation between *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*, to clarify their geographic boundary in ambiguous areas, and estimate the genetic diversity within each taxon. [Method] 18 Simple Sequence Repeat (SSR) makers were used to analyze the genetic variation of 32 *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis* populations. Phylogenetic analysis and cluster analysis were conducted to identify the grouping of these populations according to their morphology and geographic distribution. The genetic differentiation coefficients were calculated among populations within each taxon, and the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was conducted to estimate the variance components at different levels. The genetic diversity parameters, such as allele number (N_A), effective allele number (N_E), observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E) and inbreeding coefficient (F_{IS}), were calculated for each taxon and each population. [Result] The genetic diversity of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* was higher than that of *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*. Compared with *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*, *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* had lower genetic differentiation coefficients between populations; and AMOVA analysis found that the percentage of variance among populations within taxa was lower in *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* (25.5%) than in *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis* (36.7%), suggesting that the differentiation among geographical populations of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* was lower than that of *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*, and the genetic variation of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* was mainly between individuals. Phylogenetic analysis suggested that all individuals of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* mainly clustered into one clade, while several highly differed clades were found in *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*, and the subsp. *sinensis* was closer with Sichan subsp. *yunnanensis* clade than with others. By population genetic cluster analysis, all *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis* individuals were divided into two major branches, and hybridization between them were found in several populations, especially in populations Hongyuan and Songpan that located in northern Sichuan province. [Conclusion] *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* has higher genetic diversity and lower genetic differentiation than that of *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*. Hongyuan and Songpan counties in northern Sichuan province are most likely to be the distribution boundary between *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* and *H. rhamnoides* subsp. *yunnanensis*.

Keywords: *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*; *Hippophae rhamnoides* subsp. *yunnanensis*; SSR; genetic differentiation; genetic diversity

(责任编辑: 张 研)