•研究报告•

中国西南地区重要木本油料植物扁核木的遗传结构及成因

叶俊伟^{1,2}, 田斌^{1*}

1. 西南林业大学国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 昆明 650224; 2. 中国科学院昆明植物研究所中国西南野生生物种质资源库, 昆明 650201

摘要: 扁核木(*Prinsepia utilis*)为中国西南地区温带森林重要的木本油料植物, 但对其野生资源种群遗传结构及成因的了解严重不足。我们采用核微卫星分子标记, 对32个扁核木自然种群共377个个体的群体演化历史进行了探讨, 并评估其遗传资源。研究发现扁核木种群自西向东可划分4个遗传群组, 即喜马拉雅、横断山以及云贵高原西部和东部群组。其中, 最大的遗传分化存在于喜马拉雅和其他区域种群间。与喜马拉雅和云贵高原东部群组相比, 横断山和云贵高原西部群组混合了其他群组的遗传成分。种群动态历史分析显示中部2个群组在喜马拉雅和云贵高原东部群组形成后形成, 不同群组间的分化均发生在更新世晚期。地理隔离和环境隔离分析表明扁核木种群间的遗传分化主要由环境差异导致。环境差异分析显示不同群组间的气候存在不同程度的差异, 其中喜马拉雅和云贵高原东部群组与中部2个群组间的差异显著。此外, 结合该物种不同时期的生态位模拟数据, 我们认为喜马拉雅和云贵高原地区的遗传资源在未来需要优先保护。

关键词: 核微卫星; 遗传多样性; 主成分分析; 喜马拉雅

叶俊伟, 田斌 (2021) 中国西南地区重要木本油料植物扁核木的遗传结构及成因. 生物多样性, 29, 1629–1637. doi: 10.17520/biods.2021341.

Ye JW, Tian B (2021) Genetic structure and its causes of an important woody oil plant in Southwest China, *Prinsepia utilis* (Rosaceae). Biodiversity Science, 29, 1629–1637. doi: 10.17520/biods.2021341.

Genetic structure and its causes of an important woody oil plant in Southwest China, *Prinsepia utilis* (Rosaceae)

Junwei Ye^{1,2}, Bin Tian^{1*}

1 Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming 650224

2 Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201

ABSTRACT

Aims: *Prinsepia utilis* is an important woody oil species in temperate forests in Southwest China, however, almost nothing is known about its population genetic structure and the causes. So, we aim to study its evolutionary history through multiple nuclear microsatellite loci (nSSRs).

Methods: We sampled 377 individuals from 32 natural populations across all distribution range of *P. utilis*. All individuals were amplified and scored using seven self-developed nSSRs markers. Genetic structure was inferred using STRUCTURE software and principal component analysis. The most possible demographic scenario and corresponding parameters were modeled and estimated in DIYABC. Genetic diversity and genetic differentiation of each population, locus and genetic cluster were calculated. Contributions of geographic distance and environmental differences to genetic differentiation were calculate through Mantel test and partial Mantel test. At last, environmental differences among different genetic clusters was evaluated through principal component analysis using 19 climatic variables.

Results: All population can be divided into four genetic groups that are Himalayas, Hengduan Mountains, west and east

收稿日期: 2021-08-30; 接受日期: 2021-11-19

基金项目: 云南省高层次人才支持计划“青年拔尖人才”专项(YNWR-QNBJ-2020)、国家自然科学基金(41861008)和云南省教育厅科学研究基金(2018JS347)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: tianbin@swfu.edu.cn

Yunnan-Guizhou Plateau genetic groups from west to east. The greatest genetic differentiation occurs between populations in the Himalayas and other regions. In comparison with the Himalayan and east Yunnan-Guizhou Plateau groups, the Hengduan Mountains and west Yunnan-Guizhou Plateau groups have higher proportion of genetic mixture from other groups. Population demographic history analysis indicate two central groups are formed after Himalayas and east Yunnan-Guizhou Plateau groups, all divergences are occurred in late Pleistocene. The analyses of isolation by distance and isolation by environment show that the genetic differentiation of *P. utilis* is mainly caused by environmental difference. Environmental difference analysis using 19 climatic variables shows various difference among groups with significant difference exist between Himalayas and east Yunnan-Guizhou Plateau groups.

Conclusion: The distinct genetic structure of *P. utilis* is formed through the combination of Pleistocene climatic changes, complicated environment and its own biological characters. Combined with ecological niche modeling analysis in different periods, we suggest protection of genetic resources in Himalayas and Yunnan-Guizhou Plateau should be first priority.

Key words: nuclear microsatellites; genetic diversity; principal component analysis; Himalayas

中国西南地区是重要的生物多样性热点地区(李锡文和李捷, 1993; Sun et al, 2017), 丰富的历史地质活动和气候变化以及多样的地形环境条件为植物物种的形成、分化和保存提供了大量的机会(Sun et al, 2017; Muellner-Riehl, 2019; Ding et al, 2020), 使其成为生物多样性的“摇篮”和“博物馆”(Xing & Ree, 2017; Lu et al, 2018)。

谱系地理学研究表明地理隔离和环境差异是中国西南地区生物类群种群分化的重要驱动力。其中高山峡谷地形是重要的地理隔离(刘杰等, 2017), 促进了不同地理种群间的异域分化, 尤其是怒江—澜沧江分水岭(Mekong–Salween Divide, MSD)造成了明显的谱系地理间断(Ward, 1921; 叶俊伟等, 2017)。此外, “空中岛屿”间低海拔的生境也能构成扩散障碍, 限制不同“岛屿”群体间的基因流, 形成显著的遗传分化(Luo et al, 2016)。环境差异同样可以促使不同区域的种群间产生适应性分化(Liu et al, 2013; Ma et al, 2019), 导致明显的遗传结构。因此, 中国西南地区拥有丰富的物种多样性和遗传资源(Sun et al, 2017)。

扁核木(*Prinsepia utilis*)是蔷薇科东亚特有属扁核木属的多年生常绿灌木, 主要分布于中国西南的喜马拉雅、横断山及云贵高原地区。扁核木为温带森林重要的木本油料植物(出油率为30%左右), 平均盛果期可达40年, 有较高的食用、保健和药用价值(Wang et al, 2013)。此外, 扁核木适应能力和再生能力强、根系发达, 可绿化荒山(和琼姬等, 2016), 有重要生态价值。但是, 国内外对扁核木的研究多集中于其不同部位化学物质的提取、鉴定和理化活性功能的验证方面(Guan et al, 2013, 2014; Huang et

al, 2017)。对这一重要经济木本植物遗传资源的调查和评估严重缺乏, 仅有Wang等(2013)报道了其叶绿体基因组序列和变异, 以及Ma等(2019)和Jin等(2020)对扁核木所在扁核木属开展的生物地理学研究。随着农业生产的快速增长和野外资源的大量采集, 扁核木种群破碎化日趋严重。因此, 我们基于覆盖扁核木全分布区的种群采集, 通过多位点的核微卫星数据, 拟厘清其种群的遗传结构和成因以及需要重点保护和进行种质资源收集的地理区域。

1 材料与方法

1.1 样品采集和DNA提取

2015–2017年, 我们对扁核木32个种群的377个野生成年个体进行了采集(表1), 同一种群不同个体的间距至少为30 m。新鲜叶片样品采集后经硅胶干燥保存。凭证标本保存于西南林业大学国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室。所有样品的DNA用改良的CTAB法(Doyle & Doyle, 1990)提取。

1.2 核微卫星引物开发、筛选、扩增和测序

基于扁核木转录组开发可用的核微卫星引物(Ju et al, 2015)。微卫星扩增的25 μ L PCR反应体系中包含1 μ L DNA, 12.5 μ L 2 $\times$ Taq MasterMix (Sangon Biotech), 9.5 μ L ddH₂O (超纯水), 正向和反向引物各1 μ L。扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性30 s, 退火45 s, 退火温度根据引物调整(附录1), 72 $^{\circ}$ C 延伸1 min, 进行30次循环; 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。完成后在4 $^{\circ}$ C保存。通过不同区域4个种群的8个个体进一步筛选电泳条带单一清晰无杂带及多态性高易读取的引物。在微卫星引

表1 扁核木种群取样和遗传多样性信息

Table 1 Sampling and genetic diversity information of *Prinsepia utilis*

代号 Code	地点 Site	经纬度 Location	海拔 Altitude (m)	<i>n</i>	<i>A_O</i>	<i>H_E</i>	<i>H_O</i>	<i>R_S</i>	<i>P_{AR}</i>	<i>F_{IS}</i>
BAZY	云南昆明 Kunming, Yunnan	102.72° E, 25.40° N	2,370	9	20	0.45	0.63	2.45	0.01	-0.35
BBM	西藏波密 Bomi, Xizang	95.34° E, 29.99° N	2,750	14	22	0.54	0.76	2.61	0	-0.37
BDC	四川稻城 Daocheng, Sichuan	100.30° E, 28.58° N	3,310	12	21	0.46	0.62	2.55	0.12	-0.31
BDCQ	云南会泽 Huize, Yunnan	103.10° E, 25.94° N	2,220	10	22	0.48	0.67	2.74	0.07	-0.35
BES	云南峨山 E'shan, Yunnan	102.11° E, 24.28° N	2,060	6	15	0.38	0.62	—	—	-0.58
BHD	四川会东 Huidong, Sichuan	102.78° E, 26.55° N	2,370	14	22	0.47	0.65	2.61	0	-0.36
BHQ	云南鹤庆 Heqing, Yunnan	100.18° E, 26.56° N	2,200	15	27	0.64	0.86	3.28	0	-0.31
BJL	西藏吉隆 Jilong, Xizang	85.36° E, 28.39° N	3,140	12	19	0.46	0.65	2.40	0.03	-0.38
BJP	云南澄江 Chengjiang, Yunnan	102.86° E, 24.73° N	2,180	15	25	0.58	0.81	2.93	0	-0.38
BLD	云南玉龙 Yulong, Yunnan	99.46° E, 27.18° N	2,630	16	21	0.56	0.88	2.59	0	-0.54
BLJ	云南丽江 Lijiang, Yunnan	100.23° E, 27.18° N	3,650	5	19	0.52	0.78	—	—	-0.47
BLJS	云南老君山 Laojun Mountains, Yunnan	103.93° E, 23.30° N	1,640	15	25	0.55	0.84	2.83	0	-0.51
BLJW	贵州安顺 Anshun, Guizhou	105.94° E, 26.25° N	1,400	15	23	0.49	0.69	2.63	0.10	-0.36
BLLX	贵州龙里 Longli, Guizhou	106.90° E, 26.43° N	1,150	10	18	0.45	0.61	2.30	0	-0.37
BLP	云南兰坪 Lanping, Yunnan	99.42° E, 26.46° N	2,540	12	24	0.61	0.98	2.93	0	-0.57
BMG	云南马关 Maguan, Yunnan	104.39° E, 23.02° N	1,340	12	24	0.53	0.79	2.80	0.02	-0.45
BML	四川木里 Muli, Sichuan	101.25° E, 27.97° N	2,500	12	26	0.61	0.96	3.05	0.19	-0.55
BNH	云南南华 Nanhua, Yunnan	101.01° E, 25.33° N	2,320	9	21	0.52	0.75	2.73	0	-0.39
BQJ	云南曲靖 Qujing, Yunnan	103.91° E, 25.36° N	1,900	8	20	0.49	0.74	—	—	-0.44
BQL	贵州贵阳 Guiyang, Guizhou	106.69° E, 26.60° N	1,160	6	17	0.45	0.60	—	—	-0.24
BSZ	云南师宗 Shizong, Yunnan	103.98° E, 24.82° N	1,870	12	25	0.52	0.71	2.91	0.03	-0.34
BTM	西藏林芝 Linzhi, Xizang	96.58° E, 30.50° N	4,720	15	25	0.59	0.85	2.83	0.09	-0.41
BWM	云南禄劝 Luquan, Yunnan	102.83° E, 26.02° N	2,760	14	22	0.47	0.69	2.49	0	-0.46
BWN	贵州威宁 Weining, Guizhou	104.11° E, 26.74° N	2,450	13	24	0.48	0.68	2.61	0	-0.38
BWX	云南维西 Weixi, Yunnan	99.02° E, 27.80° N	2,290	9	24	0.59	0.87	2.97	0.05	-0.43
BXC	四川西昌 Xichang, Sichuan	102.35° E, 27.70° N	2,680	11	20	0.39	0.57	2.38	0.03	-0.41
BXCX	云南西畴 Xichou, Yunnan	104.79° E, 23.38° N	1,450	9	25	0.53	0.75	2.86	0	-0.37
BXJ	云南文山新街 Xinjie, Wenshan, Yunnan	104.00° E, 23.20° N	1,880	15	23	0.53	0.81	2.76	0	-0.49
BXZC	云南开远 Kaiyuan, Yunnan	103.62° E, 23.79° N	1,480	10	21	0.54	0.80	2.77	0	-0.43
BYG	西藏波密 Bomi, Xizang	95.57° E, 30.50° N	5,230	15	22	0.58	0.88	2.79	0.01	-0.48
BYXB	四川越西 Yuexi, Sichuan	102.45° E, 28.76° N	2,970	12	16	0.39	0.60	2.12	0	-0.49
BZNX	云南文山 Wenshan, Yunnan	104.42° E, 23.69° N	1,570	15	25	0.55	0.81	2.97	0	-0.45

A_O: 等位基因数量; *H_E*: 期望杂合度; *H_O*: 观测杂合度; *R_S*: 等位基因丰富度; *P_{AR}*: 私有等位基因丰富度; *F_{IS}*: 近交系数(粗体标出的种群表示符合哈温平衡)。

A_O, Allele number; *H_E*, Expected heterozygosity; *H_O*, Observed heterozygosity; *R_S*, Allelic richness; *P_{AR}*, Private allelic richness; *F_{IS}*, Inbreeding coefficient. Population in bold indicates it is under Hardy-Weinberg equilibrium.

物上添加荧光标记后(附录1), 所有个体的PCR产物送到上海生工生物工程技术服务有限公司进行分型分析。

1.3 遗传多样性和遗传结构分析

通过GENEMAPPER 3.7 (Applied Biosystems) 确定微卫星等位基因的大小。通过Micro-checker 2.2 (van Oosterhout et al, 2004)检测其是否存在无效等位基因(null alleles)。对于不同微卫星位点, 使用

FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) 计算等位基因数量(*A_O*)、观察杂合度(*H_O*)、总体遗传多样性(*H_T*)、遗传多样性(*H_S*)和遗传分化系数(*F_{ST}*)。对于不同种群, 在GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012)中计算等位基因数量、观察杂合度、期望杂合度(*H_E*)和种群间遗传分化; 在hp-rare 1.0 (Kalinowski, 2005)中计算等位基因丰富度(*R_S*)和私有等位基因丰富度(*P_{AR}*)。通过FSTAT 2.9.3检测所有位点两两间是否

存在连锁不平衡并通过经Bonferroni校正的近交系数(inbreeding coefficient; F_{IS})判断所有种群是否符合Hardy-Weinberg平衡。

在基于贝叶斯聚类分析的STRUCTURE 2.3.3 (Falush et al, 2007)中推测扁核木群体间遗传变异的地理分布模式。选择混合祖先模型(amdixture model)和关联等位基因频率模型(correlated allele frequency model)。设置burn-in长度为 1×10^5 ; MCMC长度为 1×10^6 。设置 K 值为1–20, 每个 K 值重复10次运算。通过HARVEST (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>)计算后验概率[$\ln P(D)$]和后验概率的变化速率(ΔK), 并依此推测可能性最大的分组(Pritchard et al, 2000; Evanno et al, 2005)。进一步, 我们通过不同种群间遗传分化的主成分分析推测不同遗传群组间是否有显著分化。对于不同遗传群组, 等位基因数量、观察杂合度和期望杂合度以及等位基因丰富度和私有等位基因丰富度分别由GenAlEx 6.5和hp-rare 1.0计算。不同遗传群组间的遗传分化由GenAlEx 6.5计算。

1.4 遗传分化成因

为探究扁核木种群遗传分化的成因, 我们对遗传距离与地理距离和环境差异进行了相关性分析。首先, 将GenAlEx 6.5计算的不同种群间遗传分化作为遗传距离。其次, 我们下载了WorldClim数据库(Hijmans et al, 2005)中指示温度和降水的19个气候变量, 在ArcGIS 10.2 (ESRI, Redlands, CA, USA)中通过Spatial Analyst Tools功能提取不同种群采样点的气候变量。在R 3.5.3 (<https://www.r-project.org/>)中计算不同种群气候间的欧式距离, 作为两两种群间的环境差异。同时, 在R中通过“princomp”功能对气候变量进行主成分分析以推测不同群组间的气候是否存在显著差异。然后, 通过GenAlEx 6.5中经过对数转换的地理距离[$\ln(1 + GGD)$]得到地理距离矩阵。最后, 在R中使用“partial.mantel.test”功能进行Mantel test, 即遗传距离与地理距离或环境差异的相关性, 以及partial Mantel test, 即遗传距离与地理距离(去除环境差异影响)或遗传距离与环境差异(去除地理距离影响)的相关性, 并基于 1×10^4 个置换计算显著性。

1.5 种群历史

在DIYABC 2.0 (Cornuet et al, 2014)中, 我们通过模拟探究扁核木不同遗传群组间可能的分化历

史, 并对有效种群大小和分化时间等参数进行估计。首先, 喜马拉雅群组与其他群组存在明显的遗传分化, 我们将喜马拉雅群组最先分化作为不同模型设置的前提。其次, 由于核微卫星位点数较少且需要估测的参数较多, 我们对模型的设置进行了简化。仅比较了3种不同分化历史的可能性, 3个模型不同之处在于除喜马拉雅群组外的其余3个群组中哪个群组先分化。4个群组的有效种群大小设置为10–10,000, 分化时间设置为10–10,000, 其中 $t_1 < t_2$, $t_2 < t_3$ 。突变速率设置为 1×10^{-6} 至 1×10^{-4} , mean coefficient P 设置为0–1。所有参数的分布为均匀分布。

在3个模型的模拟中, 群组内统计了等位基因数目均值(mean number of alleles)和基因多样性均值(mean genic diversity)指标, 群组间我们统计遗传分化(F_{ST})、mean index of classification和shared allele distance指标。每个模型运行 1×10^6 次模拟后, 基于1% (1×10^4)最接近观测值的数据通过逻辑回归确定最优模型后估测种群分化历史中的各项参数。

2 结果

2.1 遗传多样性

我们筛选的7对扁核木核微卫星位点均未发现无效等位基因(附录1)且不存在连锁位点。对于不同种群, 等位基因数量为15–27个, 期望杂合度和观测杂合度的范围分别是0.38–0.64和0.57–0.98, 等位基因丰富度和私有等位基因丰富度最低分别是2.12和0, 最高分别是3.28和0.19 (表1)。基于近交系数, 我们发现除BQL (贵州贵阳)种群外, 其余种群均不符合Hardy-Weinberg平衡(表1), 可能与非随机交配或种群内存在亚结构等有关。对于不同位点, 等位基因数量为5–9个, 平均值为6.57。Pru_17717位点的观测杂合度、遗传多样性和总体遗传多样性均为最低, 其余位点的遗传多样性水平类似。Pru_17717的遗传分化水平最高, 其余位点的较低, 平均水平为0.21 (附录2)。

2.2 遗传结构

在STRUCTURE分析中, 根据 $\ln P(D)$ 和 ΔK 的分布(附录3), 我们推测扁核木32个种群可能的遗传分组为 $K = 2$ 或 $K = 4$ 。当 $K = 2$ 时, 喜马拉雅地区的4个种群(BJL、BBM、BYG和BTM)与其余种群分为

具有显著遗传分化的2个遗传群组，群组间几乎没有基因交流。当 $K = 4$ 时，喜马拉雅群组保留，其余种群划分为3个不同的遗传群组，自西向东将其编码为横断山、云贵高原西部和云贵高原东部群组(图1)。喜马拉雅和云贵高原东部群组是包含其他群组遗传成分较少的群组，而横断山和云贵高原西部群组包含了较多其他群组的遗传成分，尤其是云贵高原西部群组有大量云贵高原东部群组的遗传组分(图1)。

种群间遗传分化的主成分分析支持了4个遗传群组的划分，喜马拉雅和云贵高原东部群组与其他2个群组的差异更明显(附录4)。其中遗传分化水平最高的为喜马拉雅和云贵高原东部群组间($F_{ST} = 0.16$)，其次为喜马拉雅和云贵高原西部($F_{ST} = 0.15$)、喜马拉雅和横断山($F_{ST} = 0.11$)、云贵高原东部($F_{ST} = 0.11$)以及横断山和云贵高原东部($F_{ST} = 0.09$)群组之间，最低的为横断山和云贵高原西部群组间($F_{ST} = 0.06$)。4个群组有相似的等位基因数量、

图1 扁核木32个种群遗传群组($K = 4$)的分布(a)和不同个体所属群组比值的柱状图(b)。蓝色为喜马拉雅群组，绿色为横断山群组，红色和橙色分别是云贵高原西部和东部群组。种群代号见表1。

Fig. 1 Color-coded clustering (a) and histogram of the cluster assignment of different individuals (b) of the 32 *Prinsepia utilis* populations when $K = 4$. Blue represents Himalayas group, green represents Hengduan Mountains group, red and orange represent west and east Yunnan-Guizhou Plateau group, respectively. Population codes are the same as that in Table 1.

表2 扁核木不同遗传群组的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of different genetic cluster of *Prinsepia utilis*

遗传群组 Genetic cluster	等位基因数量 A_0	观测杂合度 H_0	期望杂合度 H_E	等位基因丰富度 R_S	私有等位基因丰富度 P_{AR}
喜马拉雅 Himalayas	30	0.79	0.62	3.18	0.70
横断山 Hengduan Mountains	35	0.86	0.65	3.39	0.53
云贵高原西部 West Yunnan-Guizhou Plateau	36	0.73	0.56	3.04	0.19
云贵高原东部 East Yunnan-Guizhou Plateau	26	0.65	0.50	2.69	0.24

A_0 , Allele number; H_0 , Observed heterozygosity; H_E , Expected heterozygosity; R_S , Allelic richness; P_{AR} , Private allelic richness.

观测杂合度、期望杂合度和等位基因丰富度, 喜马拉雅群组的私有等位基因丰富度最高($P_{AR} = 0.70$) (表2)。

2.3 遗传分化成因

在Mantel test中, 遗传距离随着地理距离($r = 0.12$, $P = 0.04$)和环境差异($r = 0.48$, $P = 0$)的增大而显著升高。在去除环境差异影响后, partial Mantel test显示遗传距离与地理距离间无显著相关($r = 0.08$, $P = 0.10$); 而在去除地理距离影响后, 遗传距离与环境差异间仍存在显著相关性($r = 0.47$, $P = 0$)。在不同种群气候变量的主成分分析中, 前2个主成分可以解释84.7%的种群间气候差异。在散点图中, 不同群组间的气候存在不同程度的差异, 其中喜马拉雅和云贵高原东部群组与其他2个群组间的差异最明显, 横断山和云贵高原东西部群组间的气候存在一定的重叠(图2)。

2.4 种群分化历史

在DIYABC分析中, 横断山和云贵高原西部群组在云贵高原东部群组形成后再形成的情景得到了最高的支持($PP = 0.57$), 其他2种模型的后验概率分别是0.25和0.18 (图3)。在最优情景中, 扁核木4个群组有效种群大小类似, 为 $5.8\text{--}6.8 \times 10^4$ 。不同遗传群组依次分化的 $t_1\text{--}3$ 分别为 8.53×10^3 、 1.25×10^4 和 5.11×10^4 世代, 基于扁核木的世代时间为10年左右(和琼姬等, 2016), 不同的分化时间 $T_1\text{--}3$ 分别为 8.53×10^4 、 1.25×10^5 和 5.11×10^5 年。扁核木核微卫星每世代的突变速率为 4.30×10^{-6} (95%置信区间: $2.19 \times 10^{-6}\text{--}1.01 \times 10^{-5}$) (表3, 附录5)。

图2 扁核木32个种群间气候变量的主成分分析, 其中不同遗传群组的颜色与图1中相对应。

Fig. 2 Principal component analysis of climate variables of 32 *Prinsepia utilis* populations. Coded colors of different genetic clusters correspond to those in Fig. 1.

3 讨论

3.1 扁核木遗传结构及其成因

通过多位点的核微卫星信息, 我们发现扁核木种群存在显著的遗传结构。首先, 遗传结构最显著的存在于喜马拉雅地区与横断山和云贵高原地区种群间(图1), 形成了最高水平的群组间遗传分化。扁核木属生物地理研究也显示扁核木种群有类似格局, 在叶绿体和核糖体ITS基因中, 虽然不同的遗传谱系没有明显的地理结构, 但喜马拉雅地区种群有独特的单倍型(Ma et al, 2019; Jin et al, 2020)。该遗传分化可能由南北走向的MSD (Ward, 1921; 叶俊伟等, 2017)造成。STRUCTURE和种群间遗传

图3 DIYABC分析中3种不同的扁核木种群分化历史示意图。n1–4分别为喜马拉雅、横断山以及云贵高原西部和东部遗传群组的有效种群大小, $t_1\text{--}3$ 分别为不同分化事件的分化时间(以世代为单位), PP为后验概率。

Fig. 3 Illustration of three different scenarios of divergence history of *Prinsepia utilis* populations. $n_1\text{--}4$ represent effective population sizes of Himalayas, Hengduan Mountains, west and east Yunnan-Guizhou Plateau genetic groups, respectively; $t_1\text{--}3$ represent divergence time of different divergence events (in generations); and PP represents posterior probability.

表3 DIYABC模拟扁核木种群最优分化历史中不同参数的后验中位值及95%置信区间

Table 3 Posterior median and 95% highest posterior density interval (HPD) estimate for demographic parameters in the most possible divergence scenario of *Prinsepia utilis* in DIYABC

	<i>n</i> 1	<i>n</i> 2	<i>n</i> 3	<i>n</i> 4	<i>T</i> 1	<i>T</i> 2	<i>T</i> 3	μ	<i>P</i>
中位值 Median	6.84×10 ⁴	6.30×10 ⁴	5.84×10 ⁴	3.90×10 ⁴	8.53×10 ⁴	1.25×10 ⁵	5.11×10 ⁵	4.30×10 ⁻⁶	0.21
95% 置信区间下限 95% HPD lower	3.30×10 ⁴	2.68×10 ⁴	2.39×10 ⁴	1.21×10 ⁴	1.80×10 ⁴	2.73×10 ⁴	1.92×10 ⁵	2.19×10 ⁻⁶	0.11
95% 置信区间上限 95% HPD upper	9.53×10 ⁴	9.44×10 ⁴	9.15×10 ⁴	8.50×10 ⁴	3.49×10 ⁵	4.49×10 ⁵	8.82×10 ⁵	1.01×10 ⁻⁵	0.70

*n*1–4: 喜马拉雅、横断山、云贵高原西部和东部遗传群组的有效种群大小; *T*1–3: 分化时间(以年为单位); μ : 突变速率(每位点每世代); *P*: 广义逐步替代模型中多步突变的比例。

*n*1–4, Effective population sizes of Himalayas, Hengduan Mountains, west and east Yunnan-Guizhou Plateau genetic clusters, respectively; *T*1–3, Divergence time (in years); μ , Mutation rate (per generation per locus); *P*, The proportion of multiple step mutations in the generalized stepwise model.

分化的主成分分析均显示除喜马拉雅地区外的种群可划分为3个遗传群组(图1, 附录4)。3个群组均大致呈南北向的分布格局, 与叶绿体单倍型的格局类似(Ma et al, 2019)。推测南北向的高山峡谷地形有利于群组内南北种群的基因交流(Sun et al, 2017; Muellner-Riehl, 2019)。

遗传成因分析表明扁核木种群间显著的遗传分化主要由环境差异导致。虽然以往研究表明地理隔离在种群分化中至关重要(刘杰等, 2017), 但其对扁核木种群遗传分化的作用较小。可能是因为: (1) 虽然扁核木的花粉由小型昆虫传播, 但其种子可由鸟类传播, 长距离传播产生的基因流会导致不同群组间的遗传成分混杂, 尤其是横断山和云贵高原西部群组间(图1)。(2) 种群分化历史显示扁核木分布区东西两侧种群先分化后, 分布区中间的2个群组才形成(图2), 因此在去除环境差异的影响后, 遗传距离与地理距离没有显著相关性。4个群组间的气候存在不同程度的差异, 但气候存在显著差异的喜马拉雅和云贵高原东部种群是否形成了适应性分化(Liu et al, 2013), 仍需要进一步的探究。虽然喜马拉雅地区西侧的BJL种群与横断山及云贵高原西部种群的气候无明显差异, 但长距离和MSD的存在阻碍了基因交流。

在扁核木属的生物地理学研究中, 扁核木种群不同单倍型的共祖时间为中新世早中期(Ma et al, 2019; Jin et al, 2020), 而本研究中估测的不同群组间分化时间均为晚更新世(表3), 是由于核微卫星的突变速率远小于叶绿体/核糖体的突变速率导致(白伟宁和张大勇, 2014)。因此, 虽然扁核木的进化历史可追溯至中新世早期(Ma et al, 2019), 但其核基因显著遗传结构的形成可能是由更新世冰期间

冰期交替的气候变化导致的。

3.2 扁核木遗传资源评估

扁核木为中国西南地区温带森林重要的木本油料植物, 其遗传资源的评估对发展有效的保护和利用至关重要(Li et al, 2019)。扁核木不仅在属内有最高的遗传多样性(Ma et al, 2019), 种群内的遗传多样性同样较高(表1), 且有明显的遗传结构(图1, 2), 拥有丰富的遗传资源。

首先, 喜马拉雅种群是拥有最高水平私有等位基因频率的独特遗传群组(表2), 与其他群组间存在显著的气候差异(BJL种群除外), 存在发生适应性分化的可能(Liu et al, 2013)。在基于最大熵模型MaxEnt对扁核木过去(末次盛冰期)、现在和未来(2050年)潜在分布区的模拟中(Ma et al, 2019), 相比于现在, 过去和未来喜马拉雅地区生境的适合度更低。因此, 喜马拉雅地区是我们首要关注的区域。其次, 云贵高原东部群组也几乎不包含其他群组遗传成分(图1)。该区域的环境尤其是温度与其他区域显著不同(图2), 可能会导致扁核木出油率和有效成分含量等的不同。在潜在分布区的模拟中, 四川盆地西侧和云贵高原地区是过去和未来扁核木的最适分布区(Ma et al, 2019)。横断山和云贵高原西部群组混合了大量其他群组的遗传成分, 而在生态位模拟中, 未来横断山地区扁核木生存的适合度将有所降低(Ma et al, 2019), 预示着种群有破碎化或收缩的趋势。综上, 我们首先需要重点保护喜马拉雅和云贵高原地区的种群, 尤其是云贵高原东部群组所在区域; 对横断山地区野外种群的保护和种质的收集也需要高度重视。下一步, 我们将根据遗传资源评估的结果, 对不同区域扁核木种群的结实率、出油率和有效成分含量以及所在区域温度、

土壤和降雨量等因子进行更为详尽的调查。

致谢: 感谢刘家奇在样品采集、分子实验和数据处理中提供的帮助。

ORCID

叶俊伟 <https://orcid.org/0000-0002-3614-3631>

田斌 <https://orcid.org/0000-0003-2325-724X>

参考文献

- Bai WN, Zhang DY (2014) Current status and future directions in plant phylogeography. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 26, 125–137. (in Chinese with English abstract) [白伟宁, 张大勇 (2014) 植物亲缘地理学的研究现状与发展趋势. *生命科学*, 26, 125–137.]
- Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, Dehne-Garcia A, Gautier M, Leblois R, Marin JM, Estoup A (2014) DIYABC v2.0: A software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, 30, 1187–1189.
- Ding WN, Ree RH, Spicer RA, Xing YW (2020) Ancient orogenic and monsoon-driven assembly of the world's richest temperate alpine flora. *Science*, 369, 578–581.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7, 574–578.
- Goudet J (2001) FSTAT, A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3). <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. (accessed on 2021-08-30)
- Guan B, Peng CC, Wang CH, Jin HZ, Zhang WD (2014) Chemical constituents from the aerial parts of *Prinsepia utilis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50, 1106–1107.
- Guan B, Peng CC, Zeng Q, Cheng XR, Yan SK, Jin HZ, Zhang WD (2013) Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from *Prinsepia utilis*. *Planta Medica*, 79, 365–368.
- He QJ, He JW, Wang YP, Mu YQ, Yang WH, Yang HT, Huang XE, Wu YB, He SL, He JP (2016) Overview of *Prinsepia utilis* Royle. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 32(7), 74–78. (in Chinese with English abstract) [和琼姬, 和加卫, 王宇萍, 木永青, 杨文宏, 杨洪涛, 黄杏娥, 吴永斌, 和寿莲, 和建平 (2016) 青刺果研究概述. *中国农学通报*, 32(7), 74–78.]
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965–1978.
- Huang SQ, Ma YL, Zhang CT, Cai SB, Pang MJ (2017) Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolics in native and fermented *Prinsepia utilis* Royle seed during a simulated gastrointestinal digestion *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 37, 354–362.
- Jin WY, Li HW, Wei R, Huang BH, Liu B, Sun TT, Mabblerley DJ, Liao PC, Yang Y (2020) New insights into biogeographical disjunctions between Taiwan and the Eastern Himalayas: The case of *Prinsepia* (Rosaceae). *Taxon*, 69, 278–289.
- Ju MM, Ma HC, Xin PY, Zhou ZL, Tian B (2015) Development and characterization of EST-SSR markers in *Bombax ceiba* (Malvaceae). *Applications in Plant Sciences*, 3, 1500001.
- Kalinowski ST (2005) Hp-rare 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5, 187–189.
- Li Q, Zhao Y, Xiang XG, Chen JK, Rong J (2019) Genetic diversity of crop wild relatives under threat in Yangtze River basin: Call for enhanced *in situ* conservation and utilization. *Molecular Plant*, 12, 1535–1538.
- Li XW, Li J (1993) A preliminary floristic study on the seed plants from the region of Hengduan Mountain. *Acta Botanica Yunnanica*, 15, 217–231. (in Chinese with English abstract) [李锡文, 李捷 (1993) 横断山脉地区种子植物区系的初步研究. *云南植物研究*, 15, 217–231.]
- Liu J, Luo YH, Li DZ, Gao LM (2017) Evolution and maintenance mechanisms of plant diversity in the Qinghai-Tibet Plateau and adjacent regions: Restrospect and prospect. *Biodiversity Science*, 25, 163–174. (in Chinese with English abstract) [刘杰, 罗亚皇, 李德铎, 高连明 (2017) 青藏高原及毗邻区植物多样性演化与维持机制: 进展及展望. *生物多样性*, 25, 163–174.]
- Liu J, Möller M, Provan J, Gao LM, Poudel RC, Li DZ (2013) Geological and ecological factors drive cryptic speciation of yews in a biodiversity hotspot. *New Phytologist*, 199, 1093–1108.
- Lu LM, Mao LF, Yang T, Ye JF, Liu B, Li HL, Sun M, Miller JT, Mathews S, Hu HH, Niu YT, Peng DX, Chen YH, Smith SA, Chen M, Xiang KL, Le CT, Dang VC, Lu AM, Soltis PS, Soltis DE, Li JH, Chen ZD (2018) Evolutionary history of the angiosperm flora of China. *Nature*, 554, 234–238.
- Luo D, Yue JP, Sun WG, Xu B, Li ZM, Comes HP, Sun H (2016) Evolutionary history of the subnival flora of the Himalaya-Hengduan Mountains: First insights from comparative phylogeography of four perennial herbs. *Journal of Biogeography*, 43, 31–43.
- Ma XG, Wang ZW, Tian B, Sun H (2019) Phylogeographic analyses of the East Asian endemic genus *Prinsepia* and the

- role of the East Asian monsoon system in shaping a north-south divergence pattern in China. *Frontiers in Genetics*, 10, 128.
- Ma YZ, Wang J, Hu QJ, Li JL, Sun YS, Zhang L, Abbott RJ, Liu JQ, Mao KS (2019) Ancient introgression drives adaptation to cooler and drier mountain habitats in a cypress species complex. *Communications Biology*, 2, 213.
- Muellner-Riehl AN (2019) Mountains as evolutionary arenas: Patterns, emerging approaches, paradigm shifts, and their implications for plant phylogeographic research in the Tibeto-Himalayan region. *Frontiers in Plant Science*, 10, 195.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—An update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Sun H, Zhang JW, Deng T, Boufford DE (2017) Origins and evolution of plant diversity in the Hengduan Mountains, China. *Plant Diversity*, 39, 161–166.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Wang S, Shi C, Gao LZ (2013) Plastid genome sequence of a wild woody oil species, *Prinsepia utilis*, provides insights into evolutionary and mutational patterns of Rosaceae chloroplast genomes. *PLoS ONE*, 8, e73946.
- Ward FK (1921) The Mekong-Salween Divide as a geographical barrier. *The Geographical Journal*, 58, 49–56.
- Xing YW, Ree RH (2017) Uplift-driven diversification in the Hengduan Mountains, a temperate biodiversity hotspot. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 114, E3444–E3451.
- Ye JW, Zhang Y, Wang XJ (2017) Phylogeographic breaks and the mechanisms of their formation in the Sino-Japanese floristic region. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 41, 1003–1019. (in Chinese with English abstract) [叶俊伟, 张阳, 王晓娟 (2017) 中国-日本植物区系中的谱系地理间断及其形成机制. *植物生态学报*, 41, 1003–1019.]

(责编委: 邱英雄 责任编辑: 时意专)

附录 Supplementary Material

附录1 扁核木7个核微卫星位点的基本信息

Appendix 1 Information of seven nuclear microsatellite loci developed of *Prinsepia utilis*
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021341-1.pdf>

附录2 扁核木7个核微卫星位点的遗传多样性和遗传分化

Appendix 2 Measures of genetic diversity and genetic differentiation of seven nuclear microsatellite loci of *Prinsepia utilis*
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021341-2.pdf>

附录3 扁核木32个种群STRUCTURE分析中后验概率[lnP(D)] (a)和后验概率的变化速率(ΔK) (b)分布

Appendix 3 Distribution of the change in log-likelihood of the data for each run, lnP(D) (a), and ΔK , the second order rate of change of lnP(D) between successive K-values (b) in STRUCTURE analysis of 32 populations of *Prinsepia utilis*
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021341-3.pdf>

附录4 扁核木32个种群间遗传分化的主成分分析。其中不同遗传群组的颜色与图1中相对应。

Appendix 4 Principal component analysis of pairwise genetic differentiation of 32 *Prinsepia utilis* populations, coded colour of different genetic clusters are corresponded to that in Fig. 1
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021341-4.pdf>

附录5 DIYABC分析最优种群分化历史不同参数的先验(红色线条)和后验分布(绿色线条)

Appendix 5 Prior (red line) and posterior (green line) distributions of different parameters of the most possible divergence scenario of *Prinsepia utilis* in DIYABC analysis
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2021341-5.pdf>

叶俊伟, 田斌 (2021) 中国西南地区重要木本油料植物扁核木的遗传结构及成因. 生物多样性, 29, 1629–1637.
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2021341>

附录1 扁核木7个核微卫星位点的基本信息

Appendix 1 Information of seven nuclear microsatellite loci developed of *Prinsepia utilis*

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'–3')	荧光标记 Fluorescent label	重复模式 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature
Pru_22139	正向 Forward: TCACTTCACCAAATACGCCA	6-FAM	(TCT) ₇	56 °C
	反向 Reversed: AGGTTGAAAGCCCGGTAGTT			
Pru_17717	正向 Forward: CTACTAGCCCAGTCCTCCCC	HEX	(AG) ₉	56 °C
	反向 Reversed: ACGAGGCAACAGAAAAAGGA			
Pru_25578	正向 Forward: TGTACCGTTCGAATGAGGTG	6-FAM	(AC) ₈	56 °C
	反向 Reversed: CGGGTTGTGGGTTTAGTCAG			
Pru_25182	正向 Forward: CTTGGCTAAAGCAGCTCAGG	TAMRA	(AGAA) ₆	56 °C
	反向 Reversed: CCAAGTACCGCCAGAAGAAG			
Pru_29944	正向 Forward: GGTTCCTCCCCCTATGAAGA	HEX	(GATCA) ₅	56 °C
	反向 Reversed: ACAATCTTCAGGCGCATTCT			
Pru_28410	正向 Forward: TCCGTTTCATCAATCACAATGA	6-FAM	(AG) ₁₀	54 °C
	反向 Reversed: ACAAGGCGTCAAGGTACGTC			
Pru_23037	正向 Forward: CGGGAAAACGTACCGACTAA	TAMRA	(TAGT) ₆	54 °C
	反向 Reversed: ATGGCTCTACATAATGCCCG			

叶俊伟, 田斌 (2021) 中国西南地区重要木本油料植物扁核木的遗传结构及成因. 生物多样性, 29, 1629–1637.
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2021341>

附录2 扁核木7个核微卫星位点的遗传多样性和遗传分化

Appendix 2 Measures of genetic diversity and genetic differentiation of seven nuclear microsatellite loci of *Prinsepia utilis*

位点 Locus	A_O	H_O	H_S	H_T	F_{ST}
Pru_22139	8	0.92	0.63	0.71	0.11
Pru_17717	9	0.30	0.28	0.60	0.54
Pru_25578	6	0.83	0.58	0.65	0.10
Pru_25182	5	0.83	0.56	0.65	0.14
Pru_29944	5	0.60	0.42	0.65	0.37
Pru_28410	8	0.91	0.64	0.71	0.10
Pru_23037	5	0.85	0.58	0.63	0.08
平均值 Mean	6.57	0.75	0.53	0.66	0.21

A_O : 等位基因数量; H_O : 观测杂合度; H_S : 遗传多样性; H_T : 总体遗传多样性; F_{ST} : 遗传分化。 A_O , Allele number; H_O , Observed heterozygosity; H_S , Gene diversity; H_T , Overall gene diversity; F_{ST} , Genetic differentiation.

叶俊伟, 田斌 (2021) 中国西南地区重要木本油料植物扁核木的遗传结构及成因. 生物多样性, 29, 1629–1637.
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2021341>

附录3 扁核木32个种群STRUcTURE分析中后验概率[lnP(D)] (a)和后验概率的变化速率(ΔK) (b)分布
Appendix 3 Distribution of the change in log-likelihood of the data for each run, lnP(D) (a), and ΔK , the second order rate of change of lnP(D) between successive K-values (b) in STRUcTURE analysis of 32 populations of *Prinsepia utilis*

叶俊伟, 田斌 (2021) 中国西南地区重要木本油料植物扁核木的遗传结构及成因. 生物多样性, 29, 1629–1637.
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2021341>

附录4 扁核木32个种群间遗传分化的主成分分析。蓝色为喜马拉雅群组, 绿色为横断山群组, 红色和橙色分别是云贵高原西部和东部群组。

Appendix 4 Principal component analysis of pairwise genetic differentiation of 32 *Prinsepia utilis* populations. Blue represents Himalayas group, green represents Hengduan Mountains group, red and orange represent west and east Yunnan-Guizhou Plateau group, respectively.

叶俊伟, 田斌 (2021) 中国西南地区重要木本油料植物扁核木的遗传结构及成因. 生物多样性, 29, 1629–1637.

<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2021341>

附录 5 DIYABC 分析最优种群分化历史不同参数的先验(红色线条)和后验分布(绿色线条)。 $n1-4$: 喜马拉雅、横断山以及云贵高原西部和东部遗传群组的有效种群大小, $t1-3$: 不同种群间分化的分化时间(以世代为单位), μ : 突变速率(每位点每世代); p : 广义逐步替代模型中多步突变的比例。

Appendix 5 Prior (red line) and posterior (green line) distributions of different parameters of the most possible divergence scenario of *Prinsipia utilis* in DIYABC analysis. $n1-4$ represent effective population sizes of the Himalayas, Hengduan Mountains, west and east Yunnan-Guizhou Plateau genetic clusters, respectively, $t1-3$ represent divergence times of different divergence events (in generations). μ : Mutation rate (per generation per locus); p , The proportion of multiple step mutations in the generalized stepwise model.