

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202206063

吴诗琪, 潘凤, 赵财, 2023. 西南地区野生刺梨的遗传多样性和遗传结构研究 [J]. 广西植物, 43(11): 2065–2077.

WU SQ, PAN F, ZHAO C, 2023. Genetic diversity and structure of wild *Rosa roxburghii* in Southwest China [J]. *Guihaia*, 43(11): 2065–2077.



西南地区野生刺梨的遗传多样性和遗传结构研究

吴诗琪, 潘 凤, 赵 财*

(贵州大学 生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025)

摘 要: 为了探究西南地区野生刺梨(*Rosa roxburghii*)的遗传多样性和起源演化,该研究基于 2 段单拷贝核基因(GAPDH 和 ncpGS)和 3 段叶绿体基因(*atpF-trnH*、*trnL-trnF* 和 *trnG-trnS*)的拼接序列,对刺梨 27 个野生居群共 320 个个体进行 PCR 扩增和测序,并用相关软件对测序结果进行分析。结果表明:(1)在单拷贝核基因和叶绿体基因水平上刺梨均表现出较低的遗传多样性(scndNA: $Hd = 0.469\ 2$, $\pi = 0.000\ 49$; cpDNA: $Hd = 0.653\ 4$, $\pi = 0.000\ 65$),并且不同居群间存在较大差异。(2)分子方差分析(AMOVA)结果均显示,遗传变异主要发生在居群内,表明居群内的变异是野生刺梨遗传变异的主要来源,居群间存在明显的遗传分化(cpDNA: $F_{ST} = 0.336\ 47$, $G_{ST} = 0.273$, $N_{ST} = 0.308$; scndNA: $F_{ST} = 0.094\ 87$, $N_{ST} = 0.076$, $G_{ST} = 0.056$),刺梨的分布不具有明显的谱系地理结构($P > 0.05$)。(3)中性检验 Tajima's D 值均为不显著负值,符合中性进化模型。Fu's F_s 值均为显著负值,结合失配分析曲线,推测刺梨种群在小范围内经历过扩张,但总体上维持稳定状态。(4)根据单倍型多样性得出,毕节地区的居群遗传多样性水平较高并且拥有丰富的单倍型,推测可能为冰期避难所,因此应对其实施就地保护,对于拥有特殊性状和特有单倍型的居群也应采取优先保护措施。该文为野生刺梨资源保护和遗传育种提供了一定的参考价值。

关键词: 刺梨, 单拷贝核基因, 叶绿体基因, 遗传多样性, 遗传结构

中图分类号: Q948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)11-2065-13

Genetic diversity and structure of wild *Rosa roxburghii* in Southwest China

WU Shiqi, PAN Feng, ZHAO Cai*

(Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), College of Life Sciences/Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to study genetic diversity and the origin of wild *Rosa roxburghii* in Southwest China and provide some bases for its utilization and protection. A survey was based on the splicing sequences of two single-copy nuclear genes

收稿日期: 2022-12-04

基金项目: 贵州科技支撑计划项目(黔科合支撑[2019]2451-2号); 贵州省教育厅教育部重点实验室开放课题(黔教合KY字[2019]033); 贵州省生物科学国内一流建设学科开放基金(GNYL[2017]009); 贵州省中药材现代产业技术体系建设项目(GZCYTX-03); 贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室开放课题基金([2020]2003)。

第一作者: 吴诗琪(2000-), 硕士研究生, 主要从事植物遗传多样性研究, (E-mail) 1109792803@qq.com。

*通信作者: 赵财, 博士, 副教授, 主要从事植物多样性及保护研究, (E-mail) zhaocai_11@163.com。

(GAPDH and ncpGS) and three chloroplast genes (*atpF-trnH*, *trnL-trnF* and *trnG-trnS*). The individuals of 320 wild *R. roxburghii* from 27 wild populations in China were amplified, sequenced by PCR. After that, the sequencing results were analyzed with relevant software. The results were as follows: (1) Low genetic diversity levels were found in *R. roxburghii* of single-copy nuclear gene ($Hd = 0.469\ 2$, $\pi = 0.000\ 49$) and chloroplast gene ($Hd = 0.653\ 4$, $\pi = 0.000\ 65$). But there were significant differences among different populations. (2) Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic variation almost occurred within populations, which indicated that population variation was the main source of genetic variation in wild *R. roxburghii*. It existed obvious genetic differentiation among populations (cpDNA: $F_{ST} = 0.336\ 47$, $G_{ST} = 0.273$, $N_{ST} = 0.308$; scnDNA: $F_{ST} = 0.094\ 87$, $N_{ST} = 0.076$, $G_{ST} = 0.056$). The distribution of *R. roxburghii* did not have obvious phylogeographical structure ($P > 0.05$). (3) Tajima's D value of neutral test was insignificantly negative value, indicating that *R. roxburghii* populations conformed to neutral evolution model. Fu's F_s value was significantly negative, combining the result of mismatch analysis curve, deducing that *R. roxburghii* populations had an expansion within a small range before. But generally, they remained stable. (4) According to the haplotype network, the populations of the Bijie region not only presented higher genetic diversity, but also had a lot of haplotypes. Therefore, the Bijie region was speculated to be one of the refuges of ice age. Therefore, they were supposed to be carried out the strategy of local protection, and the populations with special traits and unique haplotypes shall be protected to adopt a priority protection approach. The study provides a reference for wild *R. roxburghii* of the resource protection and genetic breeding.

Key words: *Rosa roxburghii*, single-copy nuclear gene, chloroplast gene, genetic diversity, genetic structure

随着社会生活质量的不断提高,人们越来越重视食物的营养价值。不仅如此,人类对绿色生活和绿水青山的需求更加迫切,因此需要开发利用更多优质的野生植物资源。刺梨(*Rosa roxburghii*)为蔷薇科,蔷薇属重要植物资源。原产中国西南部,特别以贵州省资源最为丰富,湖南、湖北、甘肃、陕西和华东有零星分布,是我国特有的果树资源(李楠玉等,2021)。因含有极高的维生素C成分而备受关注,其维生素C的含量比猕猴桃高9倍,被称为“维C之王”,因此深受消费者青睐。刺梨具有巨大的开发利用价值和经济价值。其果实肉质肥厚且具有浓烈的特殊香气,包含丰富的超氧化物歧化酶、过氧化物酶、多酚、刺梨黄酮、刺梨多糖、刺梨三萜、氨基酸以及微量元素等物质(张怀山等,2017)。同时,刺梨的药用价值高,其花、果、叶和籽均可入药,有清热降火、健胃、消食、滋养、润肺止咳和止泻等效果,尤其是刺梨含有丰富的超氧化物歧化酶,在心血管、消化系统和各种肿瘤疾病等防治方面的应用十分广泛(汪凯莎,2015)。因此,刺梨成为贵州省重点发展的果树行业。随着刺梨利用范围的不断扩展,相关研究也不断丰富,主要集中在化学成分以及药理作用等方面(饶浠锐等,2022)。但是,近年来,新型城市化进程加剧造成的土地侵占,以及土地

开垦,农业耕种时的滥砍滥伐等造成的生态损坏和生境破碎化,野生刺梨的种群数量和分布面积呈现下降趋势(李楠玉等,2021)。这一绿色资源并没有得到很好的开发利用,当务之急就是对野生刺梨资源做好收集和遗传背景分析及保护性利用等方面的管理工作(鲁敏等,2020)。

目前,分子标记技术已广泛运用于研究植物的遗传多样性,但刺梨种质资源分子水平的研究起步较晚。文晓鹏和邓秀新(2003)通过形态学性状和RAPD标记探索了刺梨及部分近缘种的亲缘关系,并对不同自然分布区的30个野生刺梨进行遗传多样性分析,结果表明来自贵州的样品蕴藏有最丰富的遗传多样性;鄢秀芹(2015)通过转录组测序获得刺梨大量功能基因组信息,开发了其EST-SSR标记,并利用开发的引物进行刺梨及蔷薇属种质资源的遗传多样性分析;鲁敏等(2017)基于EST-SSR标记构建贵州刺梨核心种质;张怀山(2017)利用SSR标记、ITS序列以及5个叶绿体基因对野生刺梨居群进行遗传结构及遗传多样性分析;鲁敏等(2020)对西南地区12个居群构建刺梨核心种质。综上所述,刺梨起源于西南地区,但遗传背景研究存在所使用标记遗传信息量少,采集样本数量较少,地域性相对狭窄问题,未能详细阐明刺梨的遗传多样性,地理分布格局和起源问题等。

单拷贝基因 (scnDNA) 是双亲遗传, 携带大量的遗传信息, 属于直系同源, 可以更好地反映物种的进化史 (毕毓芳等, 2019)。近年来叶绿体基因 (cpDNA) 逐渐受到广泛应用, 其特点是分子量小、序列较为保守、进化迟缓、结构单一、单亲遗传, 并且不易受外界环境影响 (樊守金和郭秀秀, 2022), 可以用来揭示物种应对环境变化的进化潜力, 对其遗传多样性的保护以及保护计划的制订实施都具有非常重要的价值 (刘海瑞等, 2018)。将二者结合分析可以更好地开展物种遗传多样性研究, 使结果更加准确。

本研究采用 2 个单拷贝核基因 (GAPDH 和 ncpGS) 和进化速率较快的 3 个叶绿体基因间隔区 *atpF-trnH*、*trnL-trnF* 和 *trnG-trnS* 序列结合对分布西南地区的 5 个省市, 27 个居群共 320 个野生刺梨材料进行分析。采用群体遗传学和谱系地理学的研究方法, 探讨野生刺梨居群遗传多样性和遗传格局, 种群历史动态, 并探究野生刺梨的起源演化历史进程, 为刺梨的资源保护和遗传育种提供科学参考资料。同时, 也为西南地区植物区系演化和物种形成机制研究奠定一定的基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本研究的 320 个刺梨材料采自贵州省、四川省、云南省、重庆市和湖北省共 5 个省市, 覆盖了整个西南地区的 27 个自然居群 (表 1)。根据当地的分布规模决定居群的样本数量, 每个居群采样 5~18 个不等, 单个样本间距离 50 m 以上 (图 1)。每株采取新鲜幼嫩的叶片 10~20 g, 将采集好的叶片就地迅速保存于采集袋中, 加入硅胶进行干燥保存, 后用于 DNA 提取。所采集的凭证标本存放于贵州大学生命科学学院中。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

采用天根生化科技 (北京) 有限公司的植物基因组 DNA 试剂盒 (DP305) 提取刺梨 DNA。利用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 是否提取成功。3 段叶绿体基因序列 (*atpF-trnH*、*trnL-trnF* 和 *trnG-trnS*) 和 2 段单拷贝核基因 (GAPDH 和 ncpGS) 分别通过 5 段引物进行 PCR 扩增 (表 2)。PCR 扩增反应为 25 μ L 体系: $2 \times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L; 上游引物、下游引物和 DNA 各 1 μ L; dd H₂O

9.5 μ L。扩增后得到的 PCR 产物经 2% 的凝胶电泳检测后将凝胶成像系统上有清晰、明亮条带的样品送往北京擎科生物科技有限公司 (重庆分公司) 进行纯化及测序。

对于单拷贝核基因 ncpGS 序列所使用的反应程序: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 95 $^{\circ}$ C 45 s, 退火 51 $^{\circ}$ C 45 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 34 次, 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min, 12 $^{\circ}$ C 恒温保存。GAPDH 序列所使用的反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min, 变性 95 $^{\circ}$ C 50 s, 退火 57 $^{\circ}$ C 50 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 34 次, 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min, 12 $^{\circ}$ C 恒温保存。对于叶绿体基因 *atpF-trnH* 序列所使用的反应程序: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 50 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 50 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 34 次, 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min, 12 $^{\circ}$ C 恒温保存。*trnL-trnF* 序列所使用的反应条件: 预变性 96 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 40 s, 退火 54 $^{\circ}$ C 40 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次, 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min, 12 $^{\circ}$ C 恒温保存。*trnG-trnS* 序列所使用的反应程序: 预变性 85 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 95 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 54 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 34 次, 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min, 12 $^{\circ}$ C 恒温保存。

1.3 数据处理与分析

获得测序结果后, 用 Mega 6 软件 (Tamura et al., 2013) 删掉序列两端不可靠的碱基序列后进行比对, 使用 BioEdit 软件 (Ahmed, 2011) 查看测序峰图, 将序列进行手工校正得到比对好的数据后, 利用 PhyloSuite 软件 (Zhang et al., 2020) 将两个单拷贝核基因以及 3 个 cpDNA 片段分别拼接成一个整体的长片段。采用 DnaSP 6 软件 (Rozas et al., 2017) 对 27 个刺梨居群进行 DNA 多态性分析, 得到相关所示数据, 如单倍型数量 (H)、单倍型多样性 (Hd)、核苷酸多样性 (π)、变异位点 (Vs)、简约信息位点 (Ps)。进行中性检验得到 Tajima's D 值和 Fu's F_s 值, 看结果是否符合中性进化模型, 从而判断是否曾经发生过扩张现象; 以及进行错配分析, 观察曲线进一步分析居群是否经历过扩张或瓶颈效应 (张晓芸等, 2019)。用 PERMUTcPSSR 软件 (Caraux & Pinloche, 2005) 计算遗传分化系数 N_{ST} 和 G_{ST} 。利用 Arlequin 软件 (Excoffier & Lischer, 2010) 进行分子方差分析 (AMOVA), 计算刺梨居群内和居群间的遗传变异, 并计算遗传分化系数 (F_{ST}) 揭示群体间遗传结构, 基因流 (Nm) 进一步表明居群的分化水平。利

表 1 27 个刺梨居群的采集信息
Table 1 Collection information of 27 *Rosa roxburghii* populations

居群来源地 Location of population	居群代号 Population code	叶绿体基因 样本数 Chloplast gene number	单拷贝核 基因样本数 Single-copy nuclear gene number	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Elevation (m)	凭证标本号 Voucher specimen number
贵州省,黔西市 Qianxi City, Guizhou Province	BJQX	12	14	106.12°	27.05°	1200	PanCL1
贵州省,金沙县 Jinsha County, Guizhou Province	BJJS	13	13	106.44°	27.46°	1100	PanCL2
贵州省,织金县 Zhijin County, Guizhou Province	BJZJ	14	11	105.77°	26.66°	2200	PanCL3
贵州省,七星关区 Qixingguan District, Guizhou Province	BJQXG	14	15	104.94°	27.15°	1510	PanCL4
贵州省,大方县 Dafang County, Guizhou Province	BJDF	14	14	105.36°	27.09°	1500	PanCL5
贵州省,纳雍县 Nayong County, Guizhou Province	BJNY	15	15	105.38°	26.78°	1420	PanCL6
贵州省,水城县 Shuichen County, Guizhou Province	LPSSC	10	10	104.96°	26.55°	1700	PanCL7
贵州省,盘县 Pan County, Guizhou Province	LPSPX	15	15	104.47°	25.71°	1750	PanCL8
贵州省,兴义市 Xingyi City, Guizhou Province	QXNXY	15	14	104.90°	25.08°	1250	PanCL9
贵州省,安龙县 Anlong County, Guizhou Province	QXNAL	14	11	105.44°	25.09°	1350	PanCL10
贵州省,贞丰县 Zhenfeng County, Guizhou Province	QXNZF	5	5	105.65°	25.38°	1050	PanCL11
贵州省,紫云县 Ziyun County, Guizhou Province	ASZY	12	9	106.08°	25.75°	1165	PanCL12
贵州省,普定县 Puding County, Guizhou Province	ASPD	11	10	105.72°	26.29°	1250	PanCL13
贵州省,平坝县 Pingba County, Guizhou Province	ASPB	12	12	106.26°	26.41°	1300	PanCL14
贵州省,花溪区 Huaxi District, Guizhou Province	GYHX	12	11	106.69°	26.33	1050	PanCL15
贵州省,龙里县 Longli County, Guizhou Province	QNLL	10	9	106.88°	26.31°	1600	PanCL16
贵州省,梵净山 Fanjing Mountain, Guizhou Province	TRFJS	12	12	108.45°	27.49°	1700	PanCL17
贵州省,习水县 Xishui County, Guizhou Province	ZYXS	8	8	106.20°	28.33°	1100	PanCL18
贵州省,湄潭县 Meitan County, Guizhou Province	ZYMT	5	5	107.48°	27.77°	950	PanCL19
贵州省,黄平县 Huangping County, Guizhou Province	QDNHP	13	16	107.90°	26.90°	800	PanCL20
贵州省,雷山县 Leishan County, Guizhou Province	QDNLS	7	9	108.07°	26.38°	1800	PanCL21
四川省,石棉县 Shimian County, Sichuan Province	SCYA	16	17	101.55°	102.31°	2000	C22
四川省,凉山州 Liangshan Prefecture, Sichuan Province	SCLS	10	10	102.25°	27.88°	1800	C23
重庆市,酉阳县 Youyang County, Chongqing City	CQYY	18	17	108.76°	28.85°	1600	C24
云南省,曲靖市 Qijing City, Yunnan Province	YNQJ	9	13	103.79°	25.48°	2000	C25
云南省,大理市 Dali City, Yunnan Province	YNDL	15	8	100.22°	25.59°	1900	C26
湖北省,宜昌市 Yichang City, Hubei Province	HBYC	9	17	110.93°	31.08°	1600	C27



图 1 刺梨采样照片

Fig. 1 Photos of collected *Rosa roxburghii*

表 2 引物名称、序列及参考文献

Table 2 Primer name, sequence and reference

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	参考文献 Reference
nepGS	F: GATGCTCACTACAAGGCTTG R: AATGTGCTCTTTGTGGCGAAG	Emshwiller et al., 1999
GAPDH	F: GATAGATTTGGAATTGTTGAGG R: GACATTGAATGAGATAAACC	Joly et al., 2006am
<i>atpF-trnH</i>	F: ACTCGCACACTCCCTTCC R: GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT	Lahaye et al., 2008
<i>trnL-trnF</i>	F: TTATTCGATCCAATCGTACCAC R: AGAAGCCATTGCAATTGCCGAAA	Taberlet et al., 1991
<i>trnG-trnS</i>	F: GAATCGAACCCGCATCGTTAG R: AACTCGTACAACGGATTAGCAATC	Small et al., 1998

用 Mega 6 软件 (Tamura et al., 2013) 计算遗传距离矩阵, 利用 Network 软件 (Bandelt et al., 1999) 基于简约性原则采用 MJ 法构建单倍型网络图 (潘凤等, 2021); 用 ArcGis 软件 (张智慧, 2017) 绘制单倍型在地理上的分布。

表 3 320 个刺梨材料基于单拷贝核基因和叶绿体基因的多态分析

Table 3 Polymorphic analysis of single-copy nuclear gene and chloroplast gene in 320 *Rosa roxburghii* samples

基因 Gene	长度 Length (bp)	变异 位点数 Variable site number (Vs)	单一 突变 位点数 Single mutation site number (Ss)	简约信息 位点数 Parsimony in formative site number (Ps)	核苷酸 多样性 Nucleo- tide diversity (π)	单倍型 多样性 Haplotype diversity (Hd)
scnDNA	1 294	8	3	5	0.000 47	0.449 0
cpDNA	1 865	20	12	8	0.000 65	0.653 4

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

如表 3 所示, 2 段单拷贝核基因 GAPDH 和 nepGS 拼接后的总长度为 1 294 bp。其中, AT 含量为 58.88%~59.12%, 与 GC 含量相差不大。共检测到 8 个核苷酸变异位点, 其中简约性的信息位点 5 个, 单一突变位点 3 个。变异位点分别为

107、154、592、1 096、1 131、1 180、1 182 和 1 225。将序列提交至 GeneBank, 序列号为 OP526995 ~ OP527024。拼接序列检测到 15 个单倍型。单拷贝核基因拼接序列的遗传多样性水平较低 ($Hd=0.4490$, $\pi=0.00047$), 但不同刺梨居群间存在较大差异 ($Hd=0\sim0.8000$, $\pi=0\sim0.00084$), 27 个居群中, 黔西南贞丰 QXNZF 居群 ($Hd=0.8000$, $\pi=0.00078$)、毕节纳雍 BJNY 居群 ($Hd=0.7143$, $\pi=0.00084$) 和毕节黔西 BJQX 居群 ($Hd=0.6703$, $\pi=0.00084$) 表现出较高的遗传多样性。遗传多样性水平最低的是云南曲靖 YNQJ 居群和黔东南雷山 QDNLS 居群 (Hd 、 π 均为 0)。

对 3 段叶绿体基因 (*atpF-trnH*、*trnL-trnF* 和 *trnG-trnS*) 序列进行拼接后的总长度为 1 865 bp, AT 含量为 71.92% ~ 72.22%, 碱基组成具有明显的 A/T 偏好性, 这与大多数叶绿体基因的碱基组成成分一致。其中, 共检测到 20 个核苷酸变异位点, 简约性的信息位点 12 个, 单一突变位点 8 个。变异位点分别为 55、88、142、175、209、344、415、423、430、545、556、573、590、591、656、696、967、1 227、1 592 和 1 740。将序列提交至 GeneBank, 序列号为 OP526975 ~ OP526994, OP545883 ~ OP545922。拼接序列检测到单倍型数量 (H) 20 个。总体的遗传多样性水平不高 ($Hd=0.6534$, $\pi=0.00065$), 但不同刺梨居群间存在较大差异 ($Hd=0\sim0.8000$, $\pi=0\sim0.00129$), 在所有居群中毕节纳雍 BJNY 居群 ($Hd=0.8000$, $\pi=0.00086$)、毕节大方 BJDF 居群 ($Hd=0.7363$, $\pi=0.00074$) 和毕节七星关 BJQXG 居群 ($Hd=0.6923$, $\pi=0.00129$) 的遗传多样性水平较高。由此可见在西南地区中, 毕节地区刺梨的遗传多样性较高, 表明该地区野生刺梨的遗传信息较丰富。遗传多样性水平最低的是湖北宜昌 HBYC 居群和四川凉山 SCLS 居群 (Hd 、 π 均为 0)。

2.2 单倍型多样性分析

基于单拷贝核基因的拼接序列, 27 个居群得到 15 个单倍型。其中, 单倍型 R-1 分布最广, 在所有居群中均有分布, 意味着单倍型 R-1 是主要单倍型, 推测 R-1 为古老单倍型, 其次为单倍型 R-3, 分布在 15 个群体中, 为优势单倍型。安顺平坝 ASPB 居群和毕节黔西 BJQX 居群共有单倍型 R-7, 单倍型 R-9 为分布在居群毕节纳雍 BJNY 和铜仁梵净山 TRFJS 中, 毕节纳雍 BJNY 居群与黔东南黄平 QDNHP 居群共有单倍型 R-12。单倍型 R-5 只分布在安顺普定

ASPD 居群中, 单倍型 R-11 只分布在遵义湄潭 ZYMT 居群中, R-13 只分布于黔东南黄平 QDNHP 居群中, R-15 六盘水盘县 LPSPX 居群中。其余单倍型均分布在多个居群中 (表 4)。

基于叶绿体基因的拼接序列, 在 27 个刺梨居群中得到 20 个单倍型, 其中单倍型 H-1 分布最广, 在 26 个居群中广泛分布, 意味着单倍型 H-1 是群体遗传构成的最主要单倍型, 推测 H-1 为古老单倍型; 其次是单倍型 H-6, 在 16 个居群中广泛分布。单倍型 H-4 和单倍型 H-5 均是安顺普定 ASPD 居群和毕节织金 BJZJ 居群共有; 单倍型 H-3 只分布在安顺紫云 ASZY 居群中, 毕节七星关 BJQXG 拥有最多的特有单倍型 (H-8、H-10、H-11 和 H-12, 共 4 个特有单倍型), 单倍型 H-13 分布在遵义湄潭 ZYMT 居群中, 重庆酉阳 CQYY 居群存在特有单倍型 H-14, 单倍型 H-15 只分布在云南大理 YNDL 居群中, 黔东南黄平 QDNHP 居群存在特有单倍型 H-16, 单倍型 H-17 分布在毕节金沙 BJJS 居群中, 单倍型 H-18 分布在毕节大方 BJDF 居群中, 毕节纳雍 BJNY 居群存在 2 个特有单倍型 H-19 和 H-20。其余单倍型均分布在多个居群中 (表 4)。

基于单拷贝核基因检测到的 15 个单倍型构建单倍型网络图 (图 2, 图 3)。由图 2 可知, 以单倍型 R-1 为中心向四周发散, 与单倍型 R-3、R-4、R-6、R-8、R-10 和 R-13 以一种突变步的方式直接相连, 又各自发生分化, 构成一个四边形。单倍型 R-10 分化出 R-12 和 R-15 分别与 R-3 和 R-8 相连。单倍型 R-7 单独分化出 R-2。同时, 网状进化图出现多个环状结构, 说明核基因重组事件的发生。

基于叶绿体基因所检测到的 20 个单倍型进行单倍型网络分析 (图 4, 图 5)。由图 4 可知, 20 个单倍型在单倍型网络构建图中呈散射分布, 可分为 H-1 和 H-9 两个分支, 每个分支又各自分化。一支以单倍型 H-1 为中心, 与单倍型 H-3、H-4、H-5、H-7、H-13、H-14 和 H-16 以一种突变步的方式直接相连并聚为一类; 另一支以 H-9 为中心, 与 H-2、H-6、H-8、H-10、H-11、H-12、H-14、H-15、H-18、H-19 和 H-20 聚类在一起, 包括毕节七星关 BJQXG、毕节大方 BJDF 和毕节纳雍 BJNY 居群的特有单倍型, 表明这一支主要以毕节地区为主。特有单倍型主要位于图的外侧, 说明是最晚发生突变的单倍型, 并且还可能存在缺失单倍型, 可能是未收集到或在进化过程中丢失。

表 4 27 个刺梨居群基于单拷贝核基因和叶绿体基因的样品信息、单倍型分布及多态分析
Table 4 Collection information, haplotype distribution and polymorphism analysis of
27 *Rosa roxburghii* populations on single-copy nuclear gene and chloroplast gene

居群代号 Population code	scnDNA 单倍型分布及多态分析 scnDNA haplotype distribution and polymorphism analysis			cpDNA 单倍型分布及多态分析 cpDNA haplotype distribution and polymorphism analysis		
	π	Hd	单倍型(样本数) Haplotype (Number)	π	Hd	单倍型(样本数) Haplotype (Number)
BJQX	0.000 84	0.670 3	R1(8)、R2(1)、R4(2)、 R6(1)、R7(2)	0.000 31	0.303 0	H1(2)、H6(10)
BJJS	0.000 12	0.153 9	R1(12)、R10(1)	0.000 16	0.153 9	H1(12)、H17(1) *
BJZJ	0.000 25	0.327 3	R1(9)、R3(2)	0.000 50	0.725 3	H1(7)、H2(3)、H4(1)、 H5(1)、H6(2)
BJQXG	0.000 21	0.257 2	R1(13)、R4(1)、R10(1)	0.001 29	0.692 3	H1(1)、H2(1)、H8(1) *、H9(8)、 H10(1) *、H11(1) *、H12(1) *
BJDF	0.000 34	0.439 6	R1(10)、R3(4)	0.000 74	0.736 3	H1(6)、H6(4)、H9(3)、H18(1) *
BJNY	0.000 84	0.714 3	R1(8)、R3(1)、R6(2)、R9(1)、 R10(2)、R12(1)	0.000 86	0.800 0	H1(4)、H6(6)、H7(1)、H9(3)、 H19(1) *、H20(1) *
LPSSC	0.000 67	0.644 4	R1(6)、R6(2)、R10(1)、R14(1)	0.000 36	0.355 6	H1(8)、H6(2)
LPSPX	0.000 37	0.361 9	R1(12)、R3(2)、R15(1) *	0.000 07	0.133 3	H1(14)、H7(1)
QXNX Y	0.000 53	0.638 1	R1(10)、R6(1)、R8(1)、R10(2)	0.000 53	0.628 5	H1(9)、H2(2)、H7(2)、H9(2)
QXNAL	0.000 65	0.672 7	R1(6)、R3(1)、R6(3)、R14(1)	0.000 34	0.604 4	H1(7)、H2(6)、H6(1)
QXNZF	0.000 78	0.800 0	R1(2)、R6(2)、R14(1)	0.000 35	0.600 0	H1(2)、H2(3)
ASZY	0.000 82	0.583 3	R1(6)、R2(1)、R3(1)、R4(1)	0.000 35	0.621 2	H1(6)、H2(5)、H3(1)
ASPD	0.000 31	0.200 0	R1(9)、R5(1) *	0.000 28	0.490 9	H1(8)、H2(1)、H4(1)、H5(1)
ASPB	0.000 55	0.561 0	R1(6)、R3(1)、R4(1)、 R6(2)、R7(1)	0.000 54	0.530 3	H1(5)、H6(7)
GYHX	0.000 54	0.618 2	R1(6)、R3(4)、R8(1)	0.000 62	0.621 2	H1(6)、H6(5)、H7(1)
QNLL	0.000 82	0.555 6	R1(6)、R2(1)、R3(2)	0.000 54	0.533 3	H1(6)、H6(4)
TRFJS	0.000 69	0.712 1	R1(6)、R3(3)、R8(2)、R9(1)	0.000 31	0.303 0	H1(2)、H6(10)
ZYXS	0.000 33	0.428 6	R1(6)、R3(2)	0.000 43	0.428 6	H1(2)、H6(6)
ZYMT	0.000 93	0.400 0	R1(4)、R11(1) *	0.000 43	0.400 0	H1(3)、H6(1)、H13(1) *
QDNHP	0.000 72	0.616 7	R1(10)、R3(1)、R8(1)、R10(2)、 R12(1)、R13(1) *	0.000 54	0.564 1	H1(8)、H6(4)、H16(1) *
QDNLS	0	0	R1(9)	0.000 29	0.285 7	H1(1)、H6(6)
SCYA	0.000 33	0.323 5	R1(15)、R3(2)	0.000 27	0.533 3	H1(8)、H2(8)
SCLS	0.000 31	0.377 8	R1(8)、R3(1)、R8(1)	0	0	H1(10)
CQYY	0.000 34	0.411 8	R1(13)、R3(2)、R8(2)	0.000 50	0.385 7	H1(14)、H9(3)、H14(1) *
YNQJ	0	0	R1(13)	0.000 54	0.535 7	H1(6)、H6(3)
YNDL	0.000 44	0.464 3	R1(4)、R6(4)	0.000 54	0.257 1	H6(14)、H15(1) *
HBYC	0.000 09	0.117 7	R4(16)、R10(1)	0	0	H1(9)

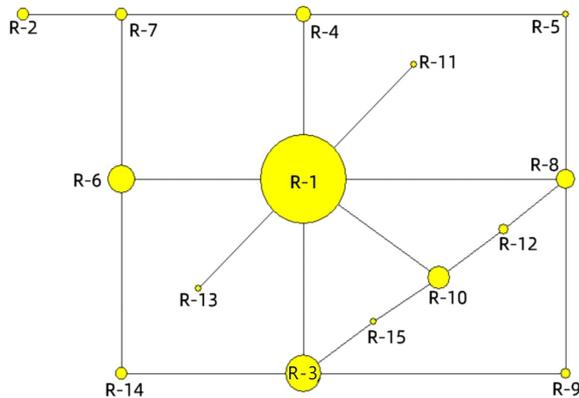
注: * 表示居群特有单倍型。

Note: * means population-specific haplotypes.

2.3 遗传结构分析

分子方差分析(AMOVA)结果显示(表5),基于单拷贝核基因的27个刺梨居群的遗传变异主要发在居群内(90.51% >> 9.49%),遗传分化系数 F_{ST} 为 0.094 87,基因流为 2.44,遗传距离为 0~

0.004,群体间遗传分化系数为 $G_{ST} = 0.056 < N_{ST} = 0.076$ ($P < 0.05$)。基于刺梨 cpDNA 在 27 个刺梨居群内的遗传变异(66.35%)显著高于居群间的遗传变异(33.65%),说明遗传变异主要存在于居群内,遗传分化系数 F_{ST} 为 0.336 47,基因流为



圆圈大小代表频率。下同。

Circle size represents frequency. The same below.

图 2 基于刺梨单拷贝核基因构建的单倍型网络图

Fig.2 Network diagram of *Rosa roxburghii* single-copy nuclear gene haplotype

0.61, 遗传距离为 0~0.005, 群体间遗传分化系数为 $G_{ST} = 0.273 < N_{ST} = 0.308$ ($P > 0.05$)。

利用 DnaSP 6 软件分别基于单拷贝核基因和叶绿体基因的拼接序列对 320 个刺梨材料进行中性和 Tajima's D 统计值分别为 -1.57516 ($0.01 < P < 0.05$) 和 -1.20185 ($P > 0.01$), 均不显著, 符合中性进化模型。这说明刺梨受到环境变化、人为因素的影响较低, 进化方式为平衡选择。Fu's F_s 值分别是 -11.003 和 -12.066 , 均为显著负值, 说明刺梨居群发生过扩张。为了进一步验证 27 个刺梨居群是否经历扩张, 对其进行失配分析(李楠玉等, 2021)。失配分析是检测物种居群的历史动态, 如果呈单峰分布, 说明该种群经历了扩张, 呈双峰或多峰分布时, 则认为该居群持续处于动态平衡或缓慢下降状态(莫忠妹等, 2022)。由图 6 可知, 叶绿体基因的失配分布图呈双峰, 而单拷贝核基因的失配分布曲线呈单峰, 推测刺梨居群只是在小范围内经历过扩张, 但总体上维持稳定状态。

3 讨论与结论

3.1 刺梨居群的遗传多样性分析

刺梨单拷贝核基因 GAPDH 和 ncpGS 联合序列 ($Hd = 0.4692$, $\pi = 0.00049$) 以及叶绿体基因 *atpF-trnH*、*trnL-trnF* 和 *trnG-trnS* 联合序列 ($Hd =$

0.6534 , $\pi = 0.00065$) 的遗传多样性显著低于高原等(2020)采用 4 段叶绿体拼接序列对苹果属植物的结果 ($Hd = 0.879$, $\pi = 0.00952$), 刘晶(2013)对蔷薇科豆梨 (cpDNA: $Hd = 0.719$, $\pi = 0.00105$) 和川梨 (cpDNA: $Hd = 0.718$, $\pi = 0.00085$) 的结果, 同时还低于张怀山(2017)对刺梨 cpDNA 的研究结果 ($Hd = 0.829$, $\pi = 0.00131$), 但高于其 ITS 序列的结果 ($Hd = 0.247$, $\pi = 0.00040$)。本研究结果表明, 刺梨具有较低的遗传多样性。西南地区刺梨的遗传多样性偏低, 可能与本研究所用 3 个 cpDNA 间隔区序列的进化速率有关, 选用的叶绿体基因序列较为保守, 需要更加精准的结果时则需要结合其他 cpDNA 间隔区序列(王崇等, 2021); 也可能是标记的基因、自身属性以及有效群体大小不同等因素所导致。因为野生刺梨在进化过程中由少数种群产生的建立者效应或者近期发生过瓶颈效应, 造成遗传变异大量丢失, 遗传多样性结果较低(何文等, 2014)。刺梨每个居群间的单倍型多样性 (Hd) 表现不同, 推测可能是西南地区的地形十分复杂, 使各居群所在的环境条件具有差异, 经过长期不同的生态环境和自然选择, 会导致具有一定地理隔离的刺梨居群的遗传多样性存在差异。

3.2 刺梨居群的遗传结构分析

种群在进化过程中, 遗传漂变、自然选择、种群历史和突变等因素的影响导致其遗传结构产生复杂的构成(任婧等, 2019)。通过对单拷贝核基因的研究发现, 遗传分化系数较低 ($F_{ST} = 0.09487$), 遗传系数为 $N_{ST} = 0.076 > G_{ST} = 0.056$ ($P > 0.05$), 虽然 P 值显著, 但是低于 Petit 等(2005)总结的基于核基因标记的 22 种植物的平均遗传分化程度 ($G_{ST} = 0.15$)。从两个基因的单倍型网络图可以看出, 高频率的单倍型分布到多数种群中, 存在明显网状结构, 但同时各单倍型在种群中交织分布, 与种群的地理分布没有明显联系, 这也与种群间基因交流广泛, 缺乏种群特有的高频率的单倍型有关。此外, 刺梨种群的不同居群间出现了大量亲缘关系靠近的单倍型, 表明刺梨群体间不存在明显的谱系地理结构。不同于叶绿体基因仅有的母系遗传, 核基因还存在花粉流, 导致刺梨种群间基因交流更频繁, 基因流 ($Nm = 2.44$) 较高。植物居群间遗传结构存在较大的差异性, 主要是地理上的隔离、突变、动荡等环境因

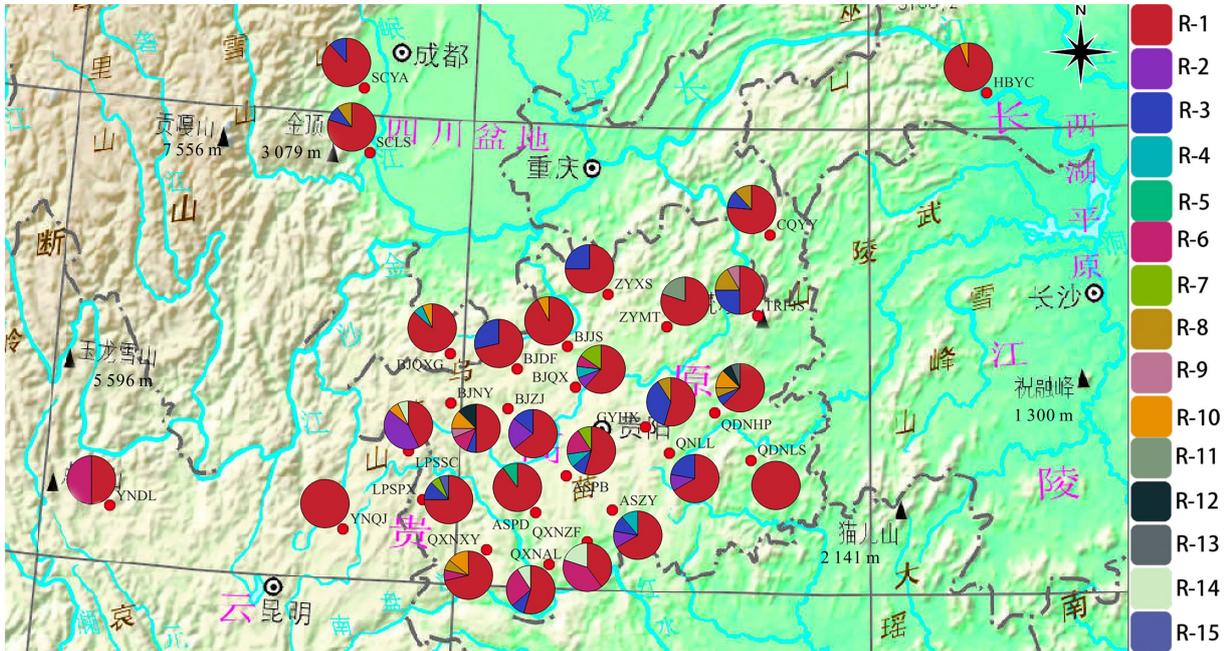


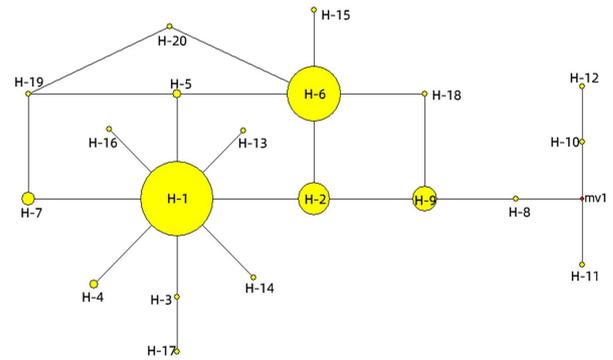
图 3 基于单拷贝核基因构建的单倍型地理分布图

Fig. 3 Haplotype geographical distribution map based on single-copy nuclear gene construction of *Rosa roxburghii*

表 5 刺梨种群的分子方差分析

Table 5 Analysis of molecular variance in *Rosa roxburghii* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	总方差 Sum of squares	变异成分 Variance component	变异百分比 Percentage of variation (%)	F_{ST}
scnDNA					
居群间 Among populations	26	16.009	0.028 83Va	9.49	0.094 87
居群内 Within population	293	80.600	0.275 09Vb	90.51	—
总计 Total	319	96.609	0.303 92	—	—
cpDNA					
居群间 Among populations	26	78.365	0.218 55Va	33.65	0.336 47
居群内 Within population	293	126.282	0.431 00Vb	66.35	—
总计 Total	319	204.647	0.649 55	—	—



红点表示丢失单倍型；mv 后的数字反映两两单倍型之间的突变步数。

Red points indicate missing haplotypes; the number after mv reflects the number of mutation steps between haplotypes.

图 4 基于刺梨叶绿体基因构建的单倍型网络图

Fig. 4 Network diagram of *Rosa roxburghii* chloroplast gene haplotype

素以及基因流的隔离导致居群的遗传分化所致 (莫忠妹等, 2022)。

叶绿体基因的居群遗传分化系数为 $G_{ST} = 0.273 < N_{ST} = 0.308 (P > 0.05)$, $F_{ST} = 0.336 47 > 0.25$,

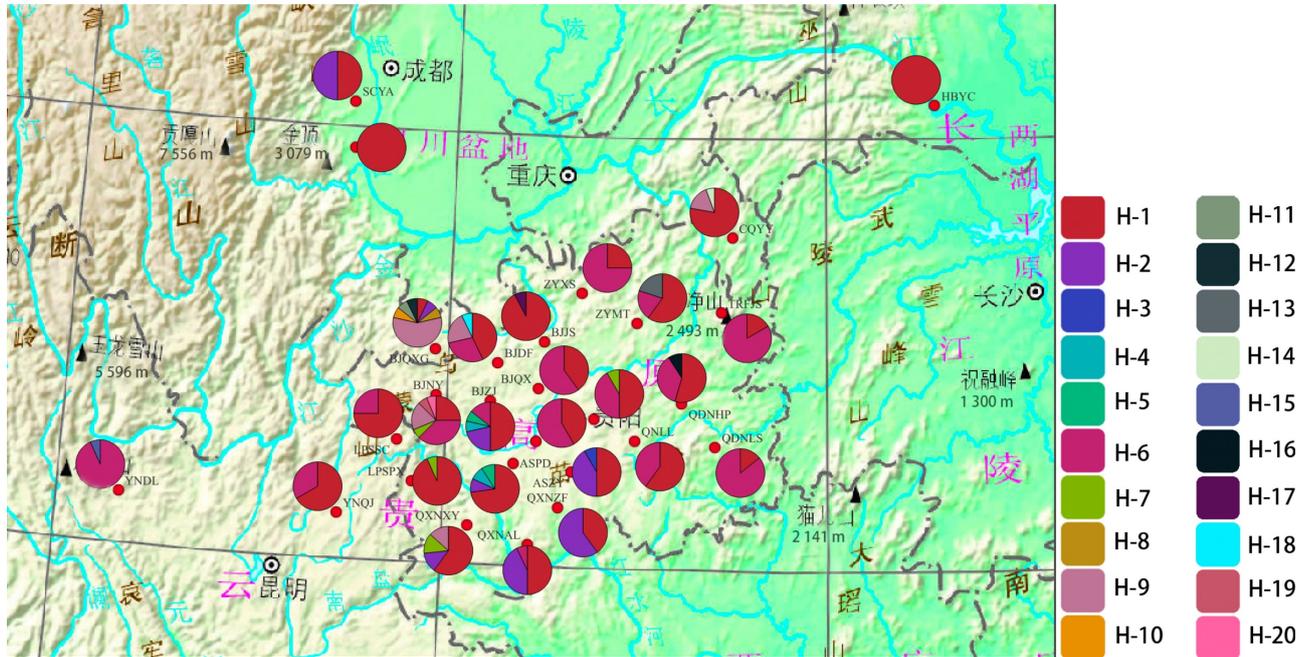


图 5 基于刺梨叶绿体基因构建的单倍型地理分布图

Fig. 5 Haplotype geographical distribution map based on chloroplast gene construction of *Rosa roxburghii*

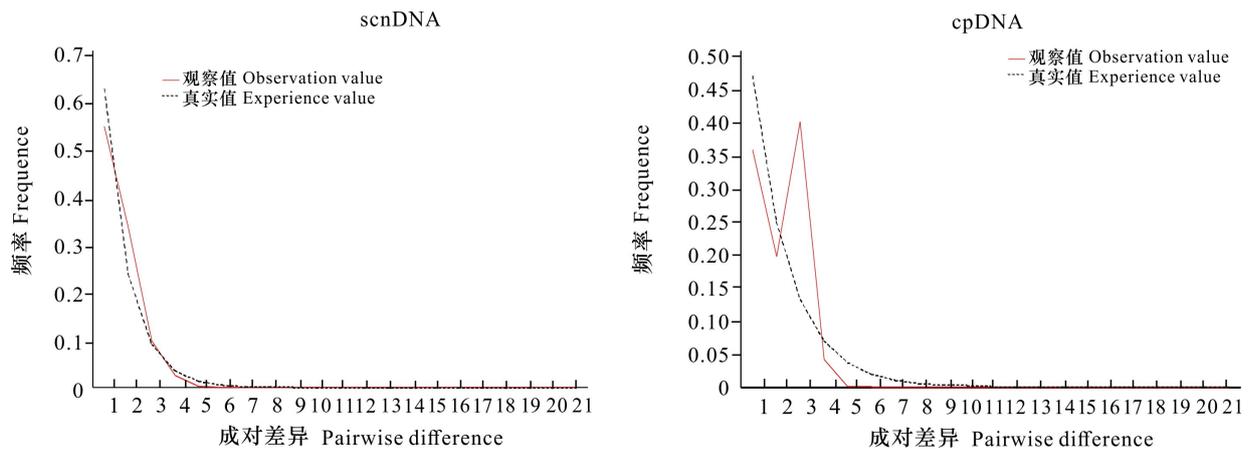


图 6 刺梨种群单拷贝核基因 (左) 和叶绿体基因 (右) 的失配分析

Fig. 6 Mismatch analysis of *Rosa roxburghii* single-copy nuclear gene (left) and chloroplast gene (right)

显著高于张怀山(2017)基于刺梨 cpDNA 的遗传分化系数 ($F_{ST} = 0.136$), 刘晶(2013)对浙江省豆梨 ($F_{ST} = 0.23$) 的研究结果说明, 刺梨叶绿体基因居群间的遗传分化较高且 N_{ST} 、 G_{ST} 均不显著 ($P > 0.05$), 在分布范围内群体间不存在明显的谱系地理结构。吴锦等(2019)研究表明特有单倍型频率高的种群无法揭示出明显的谱系地理结构, 并且

居群内部存在明显的可以识别的遗传变异, 本研究发发现西南地区的野生刺梨, 特别是以贵州省为主的居群存在较高的单倍型频率, 进一步阐明不存在明显的谱系地理结构。基因流 $Nm = 0.61 < 1$, 表明群体间基因流动频率较低, 说明居群间发生较强烈分化, 遗传漂变成为居群遗传变异的主导因素。

通过 AMOVA 分析, 结果均显示刺梨种群主要的遗传变异发生于居群内, 居群间遗传差异较小, 可能是受到奠基者效应的影响。本研究发现核基因的居群内遗传变异 (90.51%) 高于叶绿体基因的居群内遗传变异 (66.35%), 推测此结果可能的原因如下: (1) 刺梨有自交繁育系统, 而叶绿体基因仅有母系遗传; (2) 个体间花期不重叠导致居群间的花粉流有限制; (3) 地理隔离和人为因素的影响, 使刺梨呈现片段化分布; (4) 在刺梨历史基因流中, 种子流起到最主要的作用。刘慎谔 (1985) 在河流流向对植物分布的影响中提到, 刺梨多分布于四川、贵州, 而云南仅大理有分布, 推测该物种沿着金沙江古道扩散至大理, 表明河流为刺梨物种分布和基因流提供地理便利或通道, 而西南地区的高山阻隔在一定程度上阻碍了风媒和虫媒等介导的花粉流, 只能在有限范围内进行基因交流。这与张怀山 (2017) 得到刺梨种子流大于花粉流的结果一致。本研究得出野生刺梨居群遗传结构的主要特点是遗传变异主要发生在居群内, 居群间具有基因交流较频繁、遗传距离小等特点, 与张怀山 (2017)、鲁敏等 (2020) 以及李楠玉等 (2021) 的结果一致。

中性检验结果表明, Tajima's D 值均为不显著负值, 符合中性进化模型。Fu's F_s 值均为显著负值, 再结合两个单倍型网络图与错配分布曲线考虑, 存在缺失单倍型, 说明刺梨居群发生过小范围扩张, 但总体上维持稳定状态。根据叶绿体基因和单拷贝核基因的单倍型网络图表示, H-1 和 R-1 的分布范围最广, 推测其为古老单倍型。溯祖理论认为在居群中遗传多样性水平最高的区域极有可能是物种的起源中心或冰期避难所 (潘凤等, 2021)。我们在野外调查时发现西南地区的野生刺梨以贵州省分布最多, 其他省市分布较少。在本研究中贵州省内的居群遗传多样性普遍较高, 推测刺梨在西南地区的冰期避难所为贵州省, 以贵州省为主向四周扩散, 扩张时可能由于云贵高原阻断, 只能在周围发生小距离扩张, 与张怀山 (2017) 的结论一致。贵州省内遗传多样性较高的居群有毕节地区的居群, 黔西南地区的居群和安顺地区的居群, 推测在第四纪冰期时期贵州省为主要避难所且贵州省内还存在多个避难所。

3.3 刺梨的保护策略

随着城镇化进程加剧以及自然环境被破坏,

为避免刺梨种质资源的大规模遗失, 对刺梨资源的收集和保护等方面的工作刻不容缓 (鲁敏等, 2020)。在西南地区的 27 个居群中, 毕节地区不仅是贵州省的主产地之一, 有丰富的刺梨资源, 而且遗传多样性水平高, 还拥有多个特有单倍型, 应进行优先保护, 在就地保护的基础上进行种子保存, 还可采集特有单倍型居群中的少数个体以及有特殊性状的植株, 将其移至资源圃中进行保护 (何文等, 2014)。研究认为, 对种群数量很多且遗传多样性水平较高的居群, 特别是毕节地区、安顺平坝 ASPB 和黔西南贞丰 QXNZF 等居群, 应实施就地保护的策略 (鲁敏等, 2020), 对于拥有独特单倍型的居群, 如安顺紫云 ASZY、遵义湄潭 ZYMT、毕节七星关 BJQXG、毕节金沙 BJJS、毕节大方 BJDF、毕节纳雍 BJNY、重庆酉阳 CQYY 和黔东南黄平 QDNHP 居群, 进行优先保护。由于刺梨主要的遗传变异发生在居群内, 而个体维持遗传变异有着重要作用, 因此在制定迁地保护策略的同时, 应当尽量多保存所收集到的刺梨样品 (李楠玉等, 2021)。

参考文献:

- AHMED MA, 2011. BioEdit: An important software for molecular biology [J]. GEF Bull Biosci, 2(1): 60-61.
- BANDELT HJ, FORSTER P, ROHL A, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. Mol Biol Evol, 16(1): 37-48.
- BI YF, CAI HJ, PAN YH, et al, 2019. Research progress of nuclear gene barcodes identification technology in plants [J]. Mol Plant Breed, 17(23): 7840-7848. [毕毓芳, 蔡函江, 潘雁红, 等, 2019. 核基因条形码鉴定技术在植物中的研究进展 [J]. 分子植物育种, 17(23): 7840-7848.]
- CARAUX G, PINLOCHE S, 2005. PermutMatrix: A graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order [J]. Bioinformatics, 21(1): 1280-1281.
- CHANG YJ, CAO YF, ZHANG JM, et al., 2014. Studies on genetic diversity of pear germplasm resources in Liaoning Province of China based on chloroplast DNA analysis [J]. J Hortic, 41(7): 1307-1316. [常耀军, 曹玉芬, 张金梅, 等, 2014. 基于叶绿体 DNA 分析的辽宁省梨属种质遗传多样性研究 [J]. 园艺学报, 41(7): 1307-1316.]
- EMSHWILLER E, DOYLE JJ, 1991. Chloroplast-expressed glutamine synthetase (necGS): potential utility for

- phylogenetic studies with an example from *Oxalis* (Oxalidaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 12(3): 310–319.
- EXCOFFIER L, LISCHER H, 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Mol Ecol Resour*, 10(3): 564–567.
- FAN SJ, GUO XX, 2022. Advances in research and application of plant chloroplast genome [J]. *J Shandong Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 37(1): 22–31. [樊守金, 郭秀秀, 2022. 植物叶绿体基因组研究及应用进展 [J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 37(1): 22–31.]
- GAO Y, WANG DJ, WANG K, et al., 2020. Genetic diversity of *Malus* Mill. based on the sequences of chloroplast fragments [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*, 35(6): 42–51. [高原, 王大江, 王昆, 等, 2020. 基于叶绿体片段序列的苹果属植物遗传多样性 [J]. 华北农学报, 35(6): 42–51.]
- HE W, ZHANG J, HUANG ZL, et al., 2014. Genetic diversity and population genetic structure among local Chinese cherry varieties [*Cerasus pseudocerasus* (Lindl.) G. Don] based on ITS sequence [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 34(3): 463–472. [何文, 张静, 黄智林, 等, 2014. 基于 ITS 序列对栽培中国樱桃遗传多样性及其群体遗传结构的分析 [J]. 西北植物学报, 34(3): 463–472.]
- HU YC, MA J, ZHU JZ, et al., 2021. Analysis of genetic diversity of ancient *Lycium barbarum* trees based on chloroplast gene [J/OL]. *Mol Plant Breed*: 1–14. [2022–06–22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20211011.1803.008.html>. [胡永超, 马洁, 朱金忠, 等, 2021. 基于 *matK*, *psbA-trnH*, *racL-a*, *trnL-trnF* 序列分析枸杞古树的遗传多样性 [J/OL]. 分子植物育种: 1–14. [2022–06–22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20211011.1803.008.html>.]
- JOLY S, STARR JR, LEWIS WH, et al., 2006. Polyploid and hybrid evolution in roses east of the Rocky Mountains [J]. *Am J Bot*, 93(3): 412–425.
- LAHAYE R, SAVOLAINEN V, DUTHOIT S, et al., 2008. A test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park (South Africa) as a model system [J]. *Nat Preced*. DOI: <http://hdl.handle.net/10210/8915>.
- LI NY, ZHANG HS, AN HM, et al., 2021. Analysis of genetic diversity of *Rosa roxburghii* trutt. based on its sequence [J/OL]. *Mol Plant Breed*: 1–25. [2022–06–22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20210827.1325.005.html>. [李楠玉, 张怀山, 安华明, 等, 2021. 基于 ITS 序列对刺梨遗传多样性的分析 [J/OL]. 分子植物育种: 1–25. [2022–06–22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20210827.1325.005.html>.]
- LIU HR, GAO QB, ZHANG FQ, et al., 2018. Molecular genetic diversity and phylogenetic structure of *Scirpus Ribes* based on chloroplast gene sequence *rbcL-accD* [J]. *Bull Bot Res*, 38(2): 278–283. [刘海瑞, 高庆波, 张发起, 等, 2018. 基于叶绿体基因序列 *rbcL-accD* 研究薏子蔗的分子遗传多样性和谱系地理结构 [J]. 植物研究, 38(2): 278–283.]
- LIU SE, 1985. Collected Works of Liu Shen-E [M]. Beijing: Science Press. [刘慎谔, 1985. 刘慎谔文集 [M]. 北京: 科学出版社.]
- LIU J, 2013. Study on genetic diversity and population genetic structure of Dou pear and Chuan pear in China [D]. Hangzhou: Zhejiang University: 1–120. [刘晶, 2013. 中国豆梨与川梨的遗传多样性和群体遗传结构研究 [D]. 杭州: 浙江大学: 1–120.]
- LU M, YAN XQ, BAI J, et al., 2017. Construction of core collection in wild *Rosa roxburghii* from Guizhou Province using EST-SSR markers and fruits quality traits [J]. *J Hortic*, 18(9): 3098–3106. [鲁敏, 鄢秀芹, 白静, 等, 2017. 基于 EST-SSR 标记与果实品质性状的贵州野生刺梨核心种质构建 [J]. 园艺学报, 18(9): 3098–3106.]
- LU M, ZHANG HS, BAI J, et al., 2020. Genetic diversity analysis and core collection construction in *Rosa roxburghii* based on fruits quality and EST-SSR markers [J]. *Mol Plant Breed*, 18(9): 3098–3106. [鲁敏, 张怀山, 白静, 等, 2020. 基于果实品质与 EST-SSR 标记的刺梨居群遗传多样性分析及核心种质构建 [J]. 分子植物育种, 18(9): 3098–3106.]
- MO ZM, YANG CD, LI YS, et al., 2022. Analysis of genetic diversity and geographical distribution pattern of *Spiranthes sinensis* [J]. *Mol Plant Breed*, 20(3): 1037–1044. [莫忠妹, 杨传东, 李银双, 等, 2022. 绶草的遗传多样性及地理分布格局分析 [J]. 分子植物育种, 20(3): 1037–1044.]
- PAN F, MO ZM, SHI T, et al., 2021. Genetic diversity and genetic structure analysis of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit populations [J]. *Mol Plant Breed*, 19(24): 8347–8352. [潘凤, 莫忠妹, 石甜, 等, 2021. 半夏居群遗传多样性及遗传结构分析 [J]. 分子植物育种, 19(24): 8347–8352.]
- PAN YZ, ZHAO YJ, GONG X, 2021. Genetic diversity and population demography of *Eupatorium heterophyllum* (Asteraceae) [J]. *Guihaia*, 41(3): 340–350. [潘跃芝, 赵玉娟, 龚洵, 2021. 异叶泽兰的遗传多样性和居群历史动态研究 [J]. 广西植物, 41(3): 340–350.]
- PETIT RJ, DUMINIL J, FINESCHI S, et al., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations [J]. *Mol Ecol*, 14(3): 689–701.

- RAO XR, TENG MG, SUI Y, 2022. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Rosa roxburghii* [J]. J Guizhou Univ Trad Chin Med, 44(5): 61-64. [饶浠锐, 滕明刚, 隋怡, 2022. 刺梨的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 贵州中医药大学学报, 44(5): 61-64.]
- REN J, LIU JM, YAN DQ, et al., 2019. Advances in research on genetic diversity and differentiation of *Stipa* L. [J]. Chin J Grassl Sci, 41(4): 150-157. [任婧, 刘佳美, 闫冬卿, 2019. 针茅属植物遗传多样性与遗传分化研究进展 [J]. 中国草地学报, 41(4): 150-157.]
- ROZAS J, FERRER-MATA A, SANCHEZ-DELBARRIO JC, et al., 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. Mol Biol Evol, 34(12): 3299-3302.
- SHAW J, LICKKEY EB, SCHILLING EE, et al., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III [J]. Amer J Bot, 94(3): 275-288.
- TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, 1991. Universil primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Mol Biol, 17(5): 1105.
- TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Mol Biol Evol, 30(12): 2725-2729.
- WANG KS, 2015. Research progress of *Rosa roxburghii* Tratt [J]. Beijing Agric, (14): 131. [汪凯莎, 2015. 刺梨的研究进展 [J]. 北京农业, (14): 131.]
- WANG C, JIAO CH, YANG XS, et al., 2021. Genetic diversity analysis of sweet potato based on chloroplast *genetrnL-trnF*, *trnH-psbA* and *trnT-trnL* sequences [J]. J S Agric, 52(6): 1536-1544. [王崇, 焦春海, 杨新笋, 等, 2021. 基于叶绿体基因 *trnL-trnF*、*trnH-psbA* 和 *trnT-trnL* 序列的甘薯种质遗传多样性分析 [J]. 南方农业学报, 52(6): 1536-1544.]
- WENG XP, DENG XX, 2003. Establishment and optimization of PCR experimental system for *Rosa roxburghii* and its relatives [J]. J Fruit Trees, (1): 35-39. [文晓鹏, 邓秀新, 2003. 刺梨及其近缘种 PCR 实验体系的建立与优化 [J]. 果树学报, (1): 35-39.]
- WENG XP, PANG XM, DENG XX, 2003. Genetic diversity in wild accessions of *Rosa roxburghii* from four province as revealed by RAPD analysis [J]. Chin Agric Sci, (7): 823-828. [文晓鹏, 庞晓明, 邓秀新, 2003. 不同自然分布区刺梨遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中国农业科学, (7): 823-828.]
- WU J, YANG Q, WANG JL, et al., 2019. Genetic diversity of *Salix oritrepha* (Salicaceae) in Qinghai-Tibetan Plateau [J]. Guihaia, 39(9): 1180-1190. [吴锦, 杨茜, 王久利, 等, 2019. 青藏高原地区山生柳遗传多样性研究 [J]. 广西植物, 39(9): 1180-1190.]
- YAN XQ, 2015. Transcriptome analysis and development of EST-SSR markers in *Rosa roxburghii* Tratt [J]. Guiyang: Guizhou University: 1-87. [鄢秀芹, 2015. 刺梨果实转录组分析及 EST-SSR 开发与应用 [D]. 贵阳: 贵州大学: 1-87.]
- ZHANG HS, YAN XQ, LU M, et al., 2017. Analysis of the genetic diversity of wild *Rosa roxburghii* populations in Guizhou Province based on EST-SSR marker [J]. Sci Agric Sin, 50(6): 1098-1108. [张怀山, 鄢秀芹, 鲁敏, 等, 2017. 基于 EST-SSR 标记的贵州野生刺梨居群遗传多样性分析 [J]. 中国农业科学, 50(6): 1098-1108.]
- ZHANG HS, 2017. Analysis of genetic diversity based on SSR markers and ITS and cpDNA sequences of *Rosa roxburghii* Tratt [D]. Guiyang: Guizhou University: 10-12. [张怀山, 2017. 基于 SSR 标记及 ITS、cpDNA 序列的刺梨遗传多样性分析 [D]. 贵阳: 贵州大学: 10-12.]
- ZHANG YF, 2022. Application of chloroplast genome in botany research [J]. Biol Teach, 47(3): 83-85. [赵玉芬, 2022. 叶绿体基因组在植物学研究中的应用进展 [J]. 生物学教学, 47(3): 83-85.]
- ZHANG XY, YANG MQ, XU Y, et al., 2019. Study on the genetic diversity and genetic structure of *Cardiocrinum giganteum* based on *rpl16* sequences analysis [J]. J Plant Gen Resour, 20(1): 199-206. [张晓芸, 杨妙琴, 徐英, 等, 2019. 基于 *rpl16* 序列分析大百合的遗传多样性及遗传结构 [J]. 植物遗传资源学报, 20(1): 199-206.]
- ZHANG JJ, HUANG Y, ZHANG DQ, et al., 2021. Phylogeography of *Paris polyphylla* based on *trnL-trnF* sequence of chloroplast gene [J]. Chin J Trad Chin Med, 46(5): 1094-1101. [赵晶晶, 黄瑜, 张德全, 等, 2021. 基于叶绿体基因 *trnL-trnF* 序列的滇重楼谱系地理学研究 [J]. 中国中药杂志, 46(5): 1094-1101.]
- ZHANG D, GAO FL, JAKOVLCI I, et al., 2020. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. Mol Ecol Resour, 20(1). DOI: 10.1111/1755-0998.13096.
- ZHANG ZH, 2017. Geographic distribution map of ancient and famous trees at county level based on ArcGIS [J]. Shaanxi For Sci Technol, (3): 40-45. [张智慧, 2017. 基于 ArcGIS 的县级古树名木地理分布图制作 [J]. 陕西林业科技, (3): 40-45.]

(责任编辑 李莉 周翠鸣)