

基于基因分型测序(GBS)技术的堇叶紫金牛遗传结构分析

周鑫洋^{1,①}, 饶 盈^{2,①}, 夏国华^{1,②}, 马丹丹³, 陈涛梅¹, 姚熠涵¹

(1. 浙江农林大学林业与生物技术学院 浙江省森林芳香植物康养功能研究重点实验室, 浙江 杭州 311300;

2. 浙江省杭州市临安区天目山林场, 浙江 杭州 311311; 3. 浙江农林大学暨阳学院, 浙江 绍兴 311800)

摘要: 采用基因分型测序(GBS)技术对堇叶紫金牛 [*Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao] 13 个野生居群 77 份样本进行单核苷酸多态性(SNP)位点挖掘,在此基础上,对 13 个居群 77 份样本的遗传多样性、系统发育树、亲缘关系等进行分析。结果表明:共获得有效 SNP 位点 246 307 个,每份样本检测到 SNP 位点 1 154~3 789 个。13 个居群的观测杂合度为 0.156 9~0.428 9,多态信息含量为 0.078 5~0.324 4,核苷酸多样性指数为 0.000 2~0.000 7,Tajima's D 值为 0.224 7~1.093 6,Shannon's 多样性指数为 0.217 5~0.664 9,表明堇叶紫金牛整体遗传多样性水平偏低。系统发育树、主成分分析和遗传结构分析结果显示 77 份样本可划分为 6 组。亲缘关系分析结果显示:居群内个体间的亲缘关系整体较近;居群间的亲缘关系与地理距离有一定的相关性。遗传分化和基因流分析结果显示:大部分居群间存在较高的遗传分化,各居群间存在一定程度的基因交流。综上所述,堇叶紫金牛 13 个居群的整体遗传多样性偏低,但居群间的遗传分化程度较高,这与居群间的地理距离较远、基因交流较少有关。建议优先保护安徽省黄山市祁门县牯牛降、浙江省舟山市定海区蔡家岙和浙江省宁波市象山县屠家园村 3 个遗传多样性较高的居群,并开展相关繁育工作以维持和扩大居群数量。

关键词: 堇叶紫金牛; 基因分型测序(GBS); 单核苷酸多态性(SNP); 遗传结构

中图分类号: Q943.2; Q949.773.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)06-0011-11

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.06.02

Genetic structure analysis of *Ardisia violacea* based on genotyping by sequencing (GBS) technology ZHOU Xinyang^{1,①}, RAO Ying^{2,①}, XIA Guohua^{1,②}, MA Dandan³, CHEN Taomei¹, YAO Yihan¹ (1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Forest Aromatic Plants-based Healthcare Functions, School of Forestry and Bio-technology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China; 2. Lin'an Tianmu Mountain Forest Farm of Zhejiang, Hangzhou 311311, China; 3. Jiyang College, Zhejiang A&F University, Shaoxing 311800, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2023, 32(6): 11-21

Abstract: Mining of single nucleotide polymorphism (SNP) sites was conducted for 77 samples from 13 wild populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao by using genotyping by sequencing (GBS) technology, on the basis, genetic diversity, phylogenetic tree, genetic relationship, etc. of 77 samples from 13 natural populations were analyzed. The results show that a total of 246 307 effective SNP sites are obtained, and 1 154-3 789 SNP sites are detected in each sample. The observed heterozygosities of 13 populations are 0.156 9-0.428 9, the polymorphic information contents are 0.078 5-0.324 4, the nucleotide diversity indexes are 0.000 2-0.000 7, the Tajima's D values are

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY16C030004; LQ17C160005)

作者简介: 周鑫洋(1999—),男,浙江龙游人,硕士研究生,主要从事野生植物资源的开发利用研究。

饶 盈(1982—),男,浙江衢州人,硕士,工程师,主要从事林木种苗生产繁育研究。

① 共同第一作者

② 通信作者 E-mail: zjfc_ghxia@126.com

引用格式: 周鑫洋, 饶 盈, 夏国华, 等. 基于基因分型测序(GBS)技术的堇叶紫金牛遗传结构分析[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(6): 11-21.

0.224 7–1.093 6, and the Shannon's diversity indexes are 0.217 5–0.664 9, indicating that the overall genetic diversity level of *A. violacea* is relatively low. The phylogenetic tree, principal component analysis, and genetic structure analysis results show that 77 samples can be divided into 6 groups. The genetic relationship analysis result shows that the genetic relationships among individuals of interpopulation are relatively close in general; there are some correlations between genetic relationship and geographical distance of intrapopulation. The genetic differentiation and gene flow analysis results show that there are relatively high genetic differentiations among most populations, and there are gene exchanges among populations to some extent. In conclusion, the overall genetic diversity of 13 populations of *A. violacea* is relatively low, but the genetic differentiation degree of intrapopulation is relatively high, which is related with far geographical distance and lack of gene exchange between populations. It is suggested to give priority to conservation of three populations with high genetic diversity, namely Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province, Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province, and Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province, and carry out relevant breeding work to maintain and expand the population number.

Key words: *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao; genotyping by sequencing (GBS); single nucleotide polymorphism (SNP); genetic structure

堇叶紫金牛〔*Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao〕隶属于报春花科(Primulaceae)紫金牛属(*Ardisia* Sw.),仅分布于浙江、台湾和安徽^[1],其种群呈岛屿状间断分布,是中国特有的濒危植物^[2]。因果实红艳、挂果时间长,堇叶紫金牛具有很高的观赏和应用价值。此外,堇叶紫金牛对研究中国大陆和台湾植物区系演化、紫金牛属的分组及系统发育具有重要的科研价值;该种还是紫金牛属植物栽培育种及品种改良的野生基因库,对维持紫金牛属植物的遗传多样性具有重要意义。但由于生境片段化以及自身的生理生态学特性,堇叶紫金牛野生居群更新受到严重干扰,居群数量急剧减少,因此,对其开展保护生物学研究已迫在眉睫。目前,对堇叶紫金牛濒危机制的研究主要集中在种群结构特征^[3–5]、繁殖技术^[6–8]以及生理生态^[9–10]方面,而关于遗传结构方面的研究尚未见报道。

基因分型测序(genotyping by sequencing, GBS)技术是一种简化基因组测序技术。虽然GBS技术不能深度覆盖全基因组,但其具有测序通量高、成本低等优点^[11–12]。GBS技术自2011年在玉米(*Zea mays* Linn.)和大麦(*Hordeum vulgare* Linn.)研究中首次应用以来^[13],已经广泛应用于资源分类、遗传分析及基因定位等领域,在不实野燕麦(*Avena sterilis* Linn.)^[14]、茶〔*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.〕^[15]、稻(*Oryza sativa* Linn.)^[16]、硬粒小麦〔*Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desfontaines) Husnot〕^[17]等植物中得到了应用。GBS技术结合全基因组关联分析,有助于发现植物的新性状及其相关变异来源,对

后续优良品种的选育和改良具有指导意义^[18]。

遗传多样性高低对濒危植物能否长期存活具有重要影响^[19],因此对濒危植物遗传多样性的研究有助于了解物种遗传背景,揭示物种濒危机制。为此,本研究采用GBS技术对堇叶紫金牛13个野生居群77份样本进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点挖掘,在此基础上,对各居群的遗传多样性、系统发育树、亲缘关系等进行了分析,以期对堇叶紫金牛的物种保护和利用及种质资源保存提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

根据堇叶紫金牛野生资源的分布状况和居群大小,以相邻植株间隔超过20 m作为划分居群的依据,在堇叶紫金牛全分布区内13个野生居群中共采集77份样本,每个居群选取健康的成年植株,每株采集2~3枚健康幼嫩的叶片,液氮速冻后于-80℃保存、备用。各居群基本信息见表1。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取与GBS文库构建 采用Axyprep DNA提取试剂盒[康宁生命科学(吴江)有限公司]提取堇叶紫金牛DNA,采用质量体积分数2%的琼脂糖凝胶电泳分析DNA完整性,采用Qubit 2.0荧光定量仪(美国赛默飞世尔科技公司)精确定量DNA浓度;用Rsa I和Hae III将检验合格的DNA样品酶切消化处理成小片段,小片段经过末端修复、

表 1 堇叶紫金牛 13 个居群的基本信息
Table 1 Basic information of 13 populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao

居群 ¹⁾ Population ¹⁾	样本数 Number of sample	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitude	林分类型 Stand type
HLS1	5	E118°56'40.93"	N30°04'13.28"	477-502	甜槠-青冈混交林 <i>Castanopsis eyrei-Quercus glauca</i> mixed forest
HLS2	6	E118°56'48.89"	N30°04'18.46"	503-611	青冈-木荷混交林 <i>Quercus glauca-Schima superba</i> mixed forest
HXY1	8	E120°05'22.39"	N30°11'41.67"	65-85	毛竹纯林 <i>Phyllostachys edulis</i> pure forest
HXY2	10	E120°05'22.47"	N30°11'41.48"	100-125	杉木-柯混交林 <i>Cunninghamia lanceolata-Lithocarpus glaber</i> mixed forest
JSL	9	E119°07'40.69"	N29°26'34.64"	280-463	甜槠-栲混交林 <i>Castanopsis eyrei-Castanopsis fargesii</i> mixed forest
HGX	3	E119°01'12.68"	N29°29'09.38"	318	毛竹纯林 <i>Phyllostachys edulis</i> pure forest
HQG	5	E117°32'03.52"	N30°00'53.31"	515-527	短尾柯-枫香树混交林 <i>Lithocarpus brevicaudatus-Liquidambar formosana</i> mixed forest
JYF	7	E120°14'22.62"	N28°53'15.72"	225-340	青冈-苦槠混交林 <i>Quercus glauca-Castanopsis sclerophylla</i> mixed forest
NNG	1	E121°40'24.29"	N29°23'50.37"	232	毛竹纯林 <i>Phyllostachys edulis</i> pure forest
NXT	10	E121°48'39.60"	N29°25'44.91"	85-120	毛竹纯林, 木荷-马尾松混交林 <i>Phyllostachys edulis</i> pure forest, <i>Schima superba-Pinus massoniana</i> mixed forest
ZDC	5	E122°09'43.97"	N30°02'43.31"	26-60	毛竹纯林 <i>Phyllostachys edulis</i> pure forest
ZDM	5	E122°09'04.43"	N30°01'54.34"	110-140	苦槠-枫香树混交林 <i>Castanopsis sclerophylla-Liquidambar formosana</i> mixed forest
TBY	3	E121°29'56.00"	N25°10'26.00"	880	—

¹⁾ HLS: 浙江省杭州市临安区顺溪坞 Shunxiwu, Lin'an District, Hangzhou City, Zhejiang Province; HXY: 浙江省杭州市西湖区云栖竹径 Bamboo-lined path at Yunqi, Xihu District, Hangzhou City, Zhejiang Province; JSL: 浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区 Lühetang Forest District, Shouchang Forest Farm, Jiande City, Zhejiang Province; HGX: 浙江省杭州市淳安县向阳村 Xiangyang Village, Chun'an County, Hangzhou City, Zhejiang Province; HQG: 安徽省黄山市祁门县牯牛降 Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province; JYF: 浙江省金华市永康市方山口村 Fangshankou Village, Yongkang City, Jinhua City, Zhejiang Province; NNG: 浙江省宁波市宁海县归云洞 Guiyun Cave, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province; NXT: 浙江省宁波市象山县屠家园村 Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province; ZDC: 浙江省舟山市定海区蔡家岙 Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; ZDM: 浙江省舟山市定海区毛陈周 Maochenzhou, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; TBY: 台湾省台北市北投区阳明山 Yangmingshan, Beitou District, Taipei City, Taiwan Province. —: 不详 Not clear.

加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等过程完成 GBS 文库制备。根据预设方案对文库进行质量体积分数 2% 的琼脂糖凝胶电泳后割胶纯化, 选择目标区间内相应的文库进入后续测序。文库质检合格后上机进行高通量测序, 测序平台为 Illumina Nova 6000, 测序模式为 PE150。

1.2.2 基因组 SNP 位点挖掘 采用 FastP 0.20.0 软件对测序得到的所有 read 进行质控, 去除接头, 去除含有无法确定碱基信息的比例大于 5% 的 read, 去除低质量 read (质量值 Q 小于等于 10 的碱基占比在 20% 以上), 统计原始测序量、有效测序量、错误率在 1% 以下的碱基占比 (Q20)、错误率在 0.1% 以下的碱基占比 (Q30)、GC 含量, 并进行综合评价, 过滤后获得 clean data。之后对所有样本的 read 进行聚类, 将聚在一起的 read 作为 1 个标签, 并生成一致性序列。采用 BWA 0.7.13 软件进行序列一致性比对, 并使用 GATK 3.8.1 软件和 Samtools 软件共同进行 SNP 检测。按照最小等位基因频率大于 0.05、数据完整度大于 60% (即不超过 40% 个体基因型缺失) 的标准对检测到的 SNP 进行过滤。

1.3 数据分析

采用 R 语言扩展包 Genepop v1.0.5 计算观测杂合度、多态信息含量、居群间的遗传距离和遗传分化系数; 采用 vcftools v0.1.14 软件计算核苷酸多样性指数、Tajima's D 值、Shannon's 多样性指数; 采用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-joining 法基于 p-distance 模型构建系统发育树, 自展重复抽样次数为 1 000 次; 采用 Admixture 1.3.0 软件分析群体结构; 采用 EIENSOFT 6.0.1 软件进行主成分分析; 采用 SPADe 1.4 软件进行亲缘关系分析; 采用 TreeMix v1.01 软件进行基因流分析。

2 结果和分析

2.1 SNP 位点挖掘

分析结果显示: 77 份堇叶紫金牛样本共获得 421.37 G 有效高质量测序数据, 平均每份样本获得 5.47 G 有效数据, 有效数据率 98.9%。Q20 值为 96.0%~98.1%, 均值为 97.5%, Q30 值为 89.6%~94.0%, 均值为 92.7%; GC 含量为 40.5%~46.0%, 均

值为 43.1%,表明测序数据质量较高,可以用于后续分析。77 份样本中获得高质量序列最多的是浙江省杭州市临安区顺溪坞的 1 个居群(HLS2)的第 1 份样本,有 54 816 017 条序列,最少的是安徽省黄山市祁门县牯牛降(HQG)居群的第 3 份样本,有 21 527 449 条序列。平均每份样本获得高质量序列 36 557 933 条,平均对比率为 99.1%。

对测序数据进行分析,共获得有效 SNP 位点 246 307 个,每份样本检测到 SNP 位点 1 154~3 789 个(均值为 3 199)。浙江省杭州市临安区顺溪坞的另 1 个居群(HLS1)的平均 SNP 位点数最多,有 3 652 个,浙江省舟山市定海区蔡家岙(ZDC)居群的平均 SNP 位点数最少,仅有 2 138 个。77 份样本中有效 SNP 位点的杂合率为 11.7%~37.0%,均值为 26.6%;有效 SNP 位点的纯合率为 63.0%~88.3%,均值为 73.5%。

2.2 遗传多样性分析

对筛选获得的 SNP 位点进行统计分析,评价不同居群的遗传多样性,结果见表 2。结果显示:13 个居群的观测杂合度为 0.156 9~0.428 9,均值为 0.353 7,表明堇叶紫金牛基因整体稳定性较差;13 个居群的多态信息含量为 0.078 5~0.324 4,均值为 0.263 4;核苷酸多样性指数为 0.000 2~0.000 7,均值为 0.000 3,表明堇叶紫金牛的核苷酸多样性较低;13 个居群的 Tajima's D 值为 0.224 7~1.093 6,均大于 0,表明堇叶紫金牛各居群受平衡选择程度较高;13 个居群的 Shannon's 多样性指数为 0.217 5~0.664 9,均值为 0.549 4,其中安徽省黄山市祁门县牯牛降(HQG)、浙江省舟山市定海区蔡家岙(ZDC)和浙江省宁波市象山县屠家园村(NXT)居群的 Shannon's 多样性指数较大,表明这 3 个居群的遗传多样性相对较高。总体来看,堇叶紫金牛遗传多样性水平偏低,各居群间遗传多样性存在一定差异。

2.3 系统发育树分析

利用鉴定到的高质量 SNP 对堇叶紫金牛 13 个居群 77 份样本进行系统发育树分析,结果见图 1。结果显示:77 份样本可分为 6 组,Ⅰ组包含浙江省杭州市临安区顺溪坞的 2 个居群(HLS1、HLS2)和浙江省杭州市西湖区云栖竹径的 2 个居群(HXY1、HXY2)的所有样本;Ⅱ组包含浙江省舟山市定海区蔡家岙(ZDC)居群的第 1 和第 4 份样本及浙江省金华市永康市方山口村(JYF)居群的所有样本;Ⅲ组包

含安徽省黄山市祁门县牯牛降(HQG)居群的所有样本;Ⅳ组包含浙江省建德市寿昌林场(JSL)居群、浙江省杭州市淳安县向阳村(HCX)居群和浙江省宁波市宁海县归云洞(NNG)居群的所有样本;Ⅴ组包含浙江省舟山市定海区毛陈周(ZDM)居群的所有样本;Ⅵ组包含浙江省宁波市象山县屠家园村(NXT)居群和台湾省台北市北投区阳明山(TBY)居群的所有样本及 ZDC 居群的第 2、第 3、第 5 份样本。其中 HCX、JSL、NNG、HQG、ZDC 和 TBY 居群内样本间的亲缘关系较近,均能聚在一起;HLS1、HLS2 居群间的个别样本有嵌套,但作为一个整体,这 2 个居群的样本也能聚在一起。ZDC 居群 5 份样本中的 3 份与 NXT 和 TBY 居群的样本聚在一起,而 ZDC 居群的另

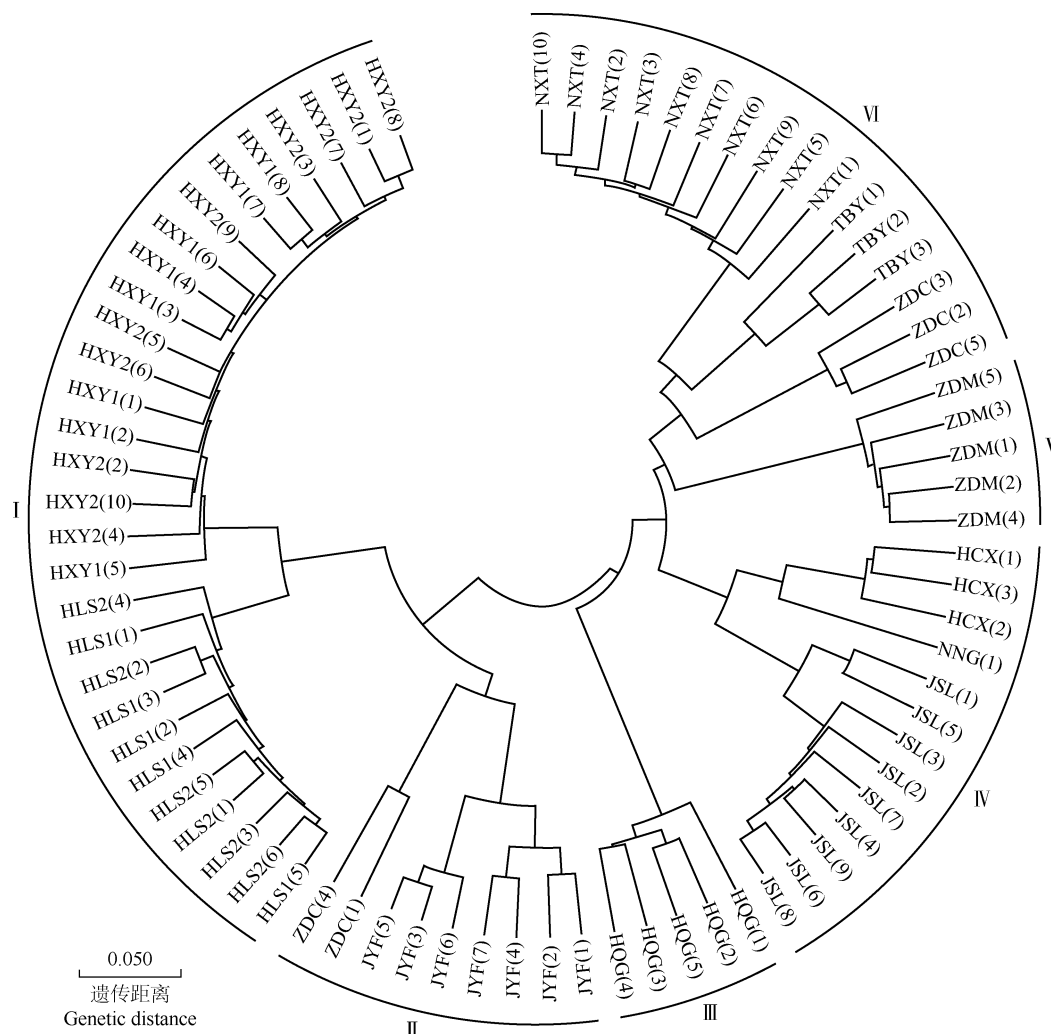
表 2 堇叶紫金牛 13 个居群的遗传多样性分析¹⁾

Table 2 Genetic diversity analysis of 13 populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao¹⁾

居群 ²⁾ Population ²⁾	H_o	PIC	P	Tajima's D	I
HLS1	0.320 2	0.233 6	0.000 3	0.724 5	0.491 0
HLS2	0.345 1	0.260 0	0.000 3	0.682 5	0.540 9
HXY1	0.365 1	0.274 8	0.000 3	0.772 6	0.574 8
HXY2	0.375 6	0.292 0	0.000 2	0.477 3	0.604 5
JSL	0.378 3	0.282 5	0.000 2	0.708 9	0.594 8
HCX	0.367 0	0.275 6	0.000 2	0.699 9	0.555 6
HQG	0.428 9	0.324 4	0.000 2	0.910 3	0.664 9
JYF	0.364 5	0.271 1	0.000 3	0.817 1	0.567 7
NNG	0.156 9	0.078 5	0.000 7	—	0.217 5
NXT	0.386 7	0.300 6	0.000 2	0.224 7	0.624 1
ZDC	0.407 7	0.308 6	0.000 2	1.093 6	0.633 1
ZDM	0.359 4	0.268 0	0.000 3	0.602 3	0.555 5
TBY	0.342 1	0.254 6	0.000 2	0.872 3	0.518 3
均值 Mean	0.353 7	0.263 4	0.000 3	0.715 5	0.549 4

¹⁾ H_o : 观测杂合度 Observed heterozygosity; PIC: 多态信息含量 Polymorphic information content; P: 核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity index; I: Shannon's 多样性指数 Shannon's diversity index. —: 无数据 No datum.

²⁾ HLS: 浙江省杭州市临安区顺溪坞 Shunxiwu, Lin'an District, Hangzhou City, Zhejiang Province; HXY: 浙江省杭州市西湖区云栖竹径 Bamboo-lined path at Yunqi, Xihu District, Hangzhou City, Zhejiang Province; JSL: 浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区 Lühetang Forest District, Shouchang Forest Farm, Jiande City, Zhejiang Province; HCX: 浙江省杭州市淳安县向阳村 Xiangyang Village, Chun'an County, Hangzhou City, Zhejiang Province; HQG: 安徽省黄山市祁门县牯牛降 Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province; JYF: 浙江省金华市永康市方山口村 Fangshankou Village, Yongkang City, Jinhua City, Zhejiang Province; NNG: 浙江省宁波市宁海县归云洞 Guiyun Cave, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province; NXT: 浙江省宁波市象山县屠家园村 Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province; ZDC: 浙江省舟山市定海区蔡家岙 Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; ZDM: 浙江省舟山市定海区毛陈周 Maochenzhou, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; TBY: 台湾省台北市北投区阳明山 Yangmingshan, Beitou District, Taipei City, Taiwan Province.



HLS: 浙江省杭州市临安区顺溪坞 Shunxiwu, Lin'an District, Hangzhou City, Zhejiang Province; HXY: 浙江省杭州市西湖区云栖竹径 Bamboo-lined path at Yunqi, Xihu District, Hangzhou City, Zhejiang Province; JSL: 浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区 Lühetang Forest District, Shouchang Forest Farm, Jiande City, Zhejiang Province; HCX: 浙江省杭州市淳安县向阳村 Xiangyang Village, Chun'an County, Hangzhou City, Zhejiang Province; HQG: 安徽省黄山市祁门县牯牛降 Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province; JYF: 浙江省金华市永康市方山口村 Fangshankou Village, Yongkang City, Jinhua City, Zhejiang Province; NNG: 浙江省宁波市宁海县归云洞 Guiyun Cave, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province; NXT: 浙江省宁波市象山县屠家园村 Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province; ZDC: 浙江省舟山市定海区蔡家岙 Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; ZDM: 浙江省舟山市定海区毛陈周 Maochenzhou, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; TBY: 台湾省台北市北投区阳明山 Yangmingshan, Beitou District, Taipei City, Taiwan Province. 括号中数字为样本编号 The numbers in brackets are sample numbers.

图1 堇叶紫金牛 13 个居群 77 份样本的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 77 samples from 13 populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao

2 份样本与 JYF 居群的样本聚在一起,说明 ZDC 居群内遗传分化比较大。

2.4 主成分分析

基于 SNP 的主成分分析结果获得堇叶紫金牛 13 个居群 77 份样本的聚类情况,结果见图 2。结果显示:根据 PC1、PC2 和 PC3 这 3 个主成分,可以将 77 份堇叶紫金牛样本分为 6 组,浙江省杭州市临安区顺溪坞 2 个居群(HLS1、HLS2)和浙江省杭州市西湖区

云栖竹径 2 个居群(HXY1、HXY2)的所有样本为一组;安徽省黄山市祁门县牯牛降(HQG)居群的所有样本和浙江省舟山市定海区蔡家岙(ZDC)居群的 2 份样本为一组;浙江省金华市永康市方山口村(JYF)、浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区(JSL)、浙江省宁波市象山县屠家园村(NXT)居群的样本各单独为一组;浙江省宁波市宁海县归云洞(NNG)、浙江省杭州市淳安县向阳村(HCX)、浙江省舟山市定海

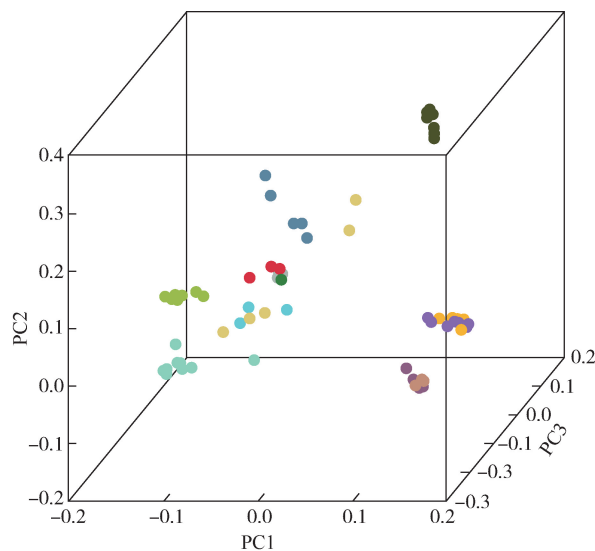
区毛陈周 (ZDM) 和台湾省台北市北投区阳明山 (TBY) 居群的所有样本及 ZDC 居群的 3 份样本为一组。这与系统发育树分析结果相近,但也存在一定的差异。

2.5 遗传结构分析

遗传结构分析结果(图 3)显示: $K=6$ 时,交叉验证误差最小,且此时 77 份样本的遗传结构聚类清晰,表明堇叶紫金牛 13 个居群 77 份样本的最优分组数为 6。

2.6 亲缘关系分析

堇叶紫金牛 77 份样本间的亲缘关系分析结果见图 4。颜色越红代表样本间的亲缘关系越近,同一居

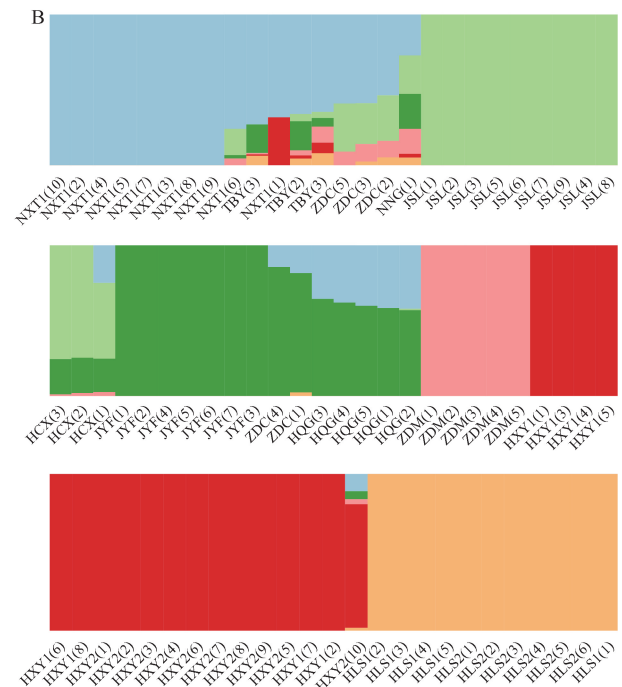
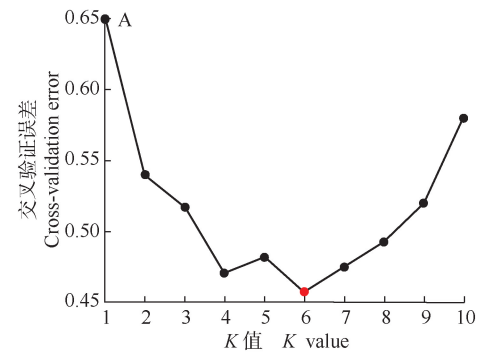


●: HQG; ●: HCX; ●: HXY1; ●: HXY2; ●: JSL; ●: HLS1; ●: HLS2; ●: NNG; ●: TBY; ●: NXT; ●: JYF; ●: ZDC; ●: ZDM.

HLS: 浙江省杭州市临安区顺溪坞 Shunxiwu, Lin'an District, Hangzhou City, Zhejiang Province; HXY: 浙江省杭州市西湖区云栖竹径 Bamboo-lined path at Yunqi, Xihu District, Hangzhou City, Zhejiang Province; JSL: 浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区 Lühetang Forest District, Shouchang Forest Farm, Jiande City, Zhejiang Province; HCX: 浙江省杭州市淳安县向阳村 Xiangyang Village, Chun'an County, Hangzhou City, Zhejiang Province; HQG: 安徽省黄山市祁门县牯牛降 Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province; JYF: 浙江省金华市永康市方山口村 Fangshankou Village, Yongkang City, Jinhua City, Zhejiang Province; NNG: 浙江省宁波市宁海县归云洞 Guiyun Cave, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province; NXT: 浙江省宁波市象山县屠家园村 Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province; ZDC: 浙江省舟山市定海区蔡家岙 Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; ZDM: 浙江省舟山市定海区毛陈周 Maochenzhou, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; TBY: 台湾省台北市北投区阳明山 Yangmingshan, Beitou District, Taipei City, Taiwan Province.

图 2 基于 SNP 主成分分析结果的堇叶紫金牛 13 个居群 77 份样本的聚类

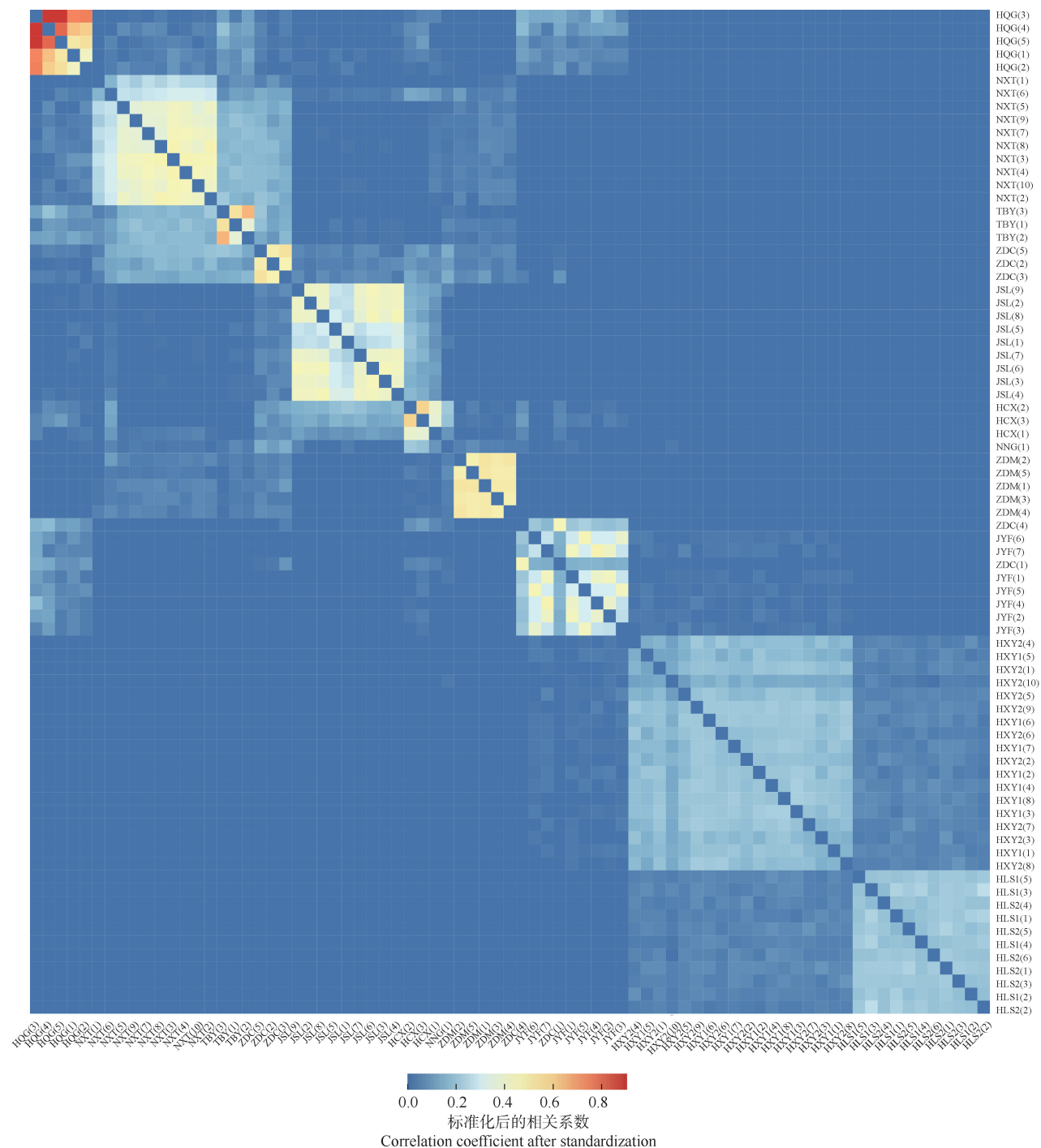
Fig. 2 Clustering of 77 samples from 13 populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao based on SNP principal component analysis result



HLS: 浙江省杭州市临安区顺溪坞 Shunxiwu, Lin'an District, Hangzhou City, Zhejiang Province; HXY: 浙江省杭州市西湖区云栖竹径 Bamboo-lined path at Yunqi, Xihu District, Hangzhou City, Zhejiang Province; JSL: 浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区 Lühetang Forest District, Shouchang Forest Farm, Jiande City, Zhejiang Province; HCX: 浙江省杭州市淳安县向阳村 Xiangyang Village, Chun'an County, Hangzhou City, Zhejiang Province; HQG: 安徽省黄山市祁门县牯牛降 Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province; JYF: 浙江省金华市永康市方山口村 Fangshankou Village, Yongkang City, Jinhua City, Zhejiang Province; NNG: 浙江省宁波市宁海县归云洞 Guiyun Cave, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province; NXT: 浙江省宁波市象山县屠家园村 Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province; ZDC: 浙江省舟山市定海区蔡家岙 Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; ZDM: 浙江省舟山市定海区毛陈周 Maochenzhou, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; TBY: 台湾省台北市北投区阳明山 Yangmingshan, Beitou District, Taipei City, Taiwan Province. 括号中数字为样本编号 The numbers in brackets are sample numbers.

图 3 堇叶紫金牛 13 个居群 77 份样本的分组 (A) 及 $K=6$ 时的遗传结构分析 (B)

Fig. 3 Cluster (A) and genetic structure analysis when $K=6$ (B) of 77 samples from 13 populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K.



HLS: 浙江省杭州市临安区顺溪坞 Shunxiwu, Lin'an District, Hangzhou City, Zhejiang Province; HXY: 浙江省杭州市西湖区云栖竹径 Bamboo-lined path at Yunqi, Xihu District, Hangzhou City, Zhejiang Province; JSL: 浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区 Lühetang Forest District, Shouchang Forest Farm, Jiande City, Zhejiang Province; HCX: 浙江省杭州市淳安县向阳村 Xiangyang Village, Chun'an County, Hangzhou City, Zhejiang Province; HQG: 安徽省黄山市祁门县牯牛降 Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province; JYF: 浙江省金华市永康市方山口村 Fangshankou Village, Yongkang City, Jinhua City, Zhejiang Province; NNG: 浙江省宁波市宁海县归云洞 Guiyun Cave, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province; NXT: 浙江省宁波市象山县屠家村 Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province; ZDC: 浙江省舟山市定海区蔡家岙 Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; ZDM: 浙江省舟山市定海区毛陈周 Maochenzhou, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; TBY: 台湾省台北市北投区阳明山 Yangmingshan, Beitou District, Taipei City, Taiwan Province. 括号中数字为样本编号 The numbers in brackets are sample numbers.

图 4 堇叶紫金牛 13 个居群 77 份样本间的亲缘关系热图
Fig. 4 Heat map of genetic relationship between 77 samples from 13 populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao

群内多个样本间热图呈红色说明这些样本可能构成了一个亲缘关系紧密的家系群体;反之,颜色越蓝说明样本间的亲缘关系越远。结果显示:堇叶紫金牛居群内个体间的亲缘关系较近。其中安徽省黄山市祁门县牯牛降(HQG)居群内样本间的亲缘关系最近,浙江省宁波市象山县屠家园村(NXT)、台湾省台北市北投区阳明山(TBY)、浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区(JSL)、浙江省舟山市定海区毛陈周(ZDM)居群内样本间的亲缘关系较近,而浙江省杭州市西湖区云栖竹径 2 个居群(HXY1、HXY2)和浙江省杭州市临安区顺溪坞 2 个居群(HLS1、HLS2)居群内样本间的亲缘关系较远。居群间的亲缘关系与地理距离有一定的相关性,HLS1、HLS2、HXY1、HXY2 居群间的亲缘关系较近,但这 4 个居群与地理位置邻近的 HQG、浙江省杭州市淳安县向阳村(HCX)、JSL 居群的亲缘关系均较远。NXT、TBY 和浙江省舟山市定海

区蔡家岙(ZDC)居群间亲缘关系较近;HCX 居群与 TBY、JYF 和 ZDC 居群间亲缘关系较远。

2.7 遗传分化和基因流分析

结果(表 3)显示:堇叶紫金牛 13 个居群间的遗传距离为 0.059 0~0.393 8,遗传分化系数为 0.000 0~0.423 0,且大部分(80.8%)居群间的遗传分化系数大于 0.250 0,表明大部分居群间存在较高的遗传分化。浙江省杭州市西湖区云栖竹径 2 个居群(HXY1 和 HXY2)间及浙江省杭州市临安区顺溪坞 2 个居群(HLS1 和 HLS2)间的遗传分化系数较小,遗传距离较近,可能是由于这 2 个居群间的地理距离较小;而 HXY1 和 HXY2 居群与地理距离较远的台湾省台北市北投区阳明山(TBY)居群和安徽省黄山市祁门县牯牛降(HQG)居群间的遗传分化系数均较大(均大于 0.400 0),遗传距离也较远。说明堇叶紫金牛居群间遗传分化系数与地理距离存在一定的相关性。

表 3 堇叶紫金牛居群间的遗传距离和遗传分化系数¹⁾

Table 3 Genetic distance and genetic differentiation coefficient between populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao¹⁾

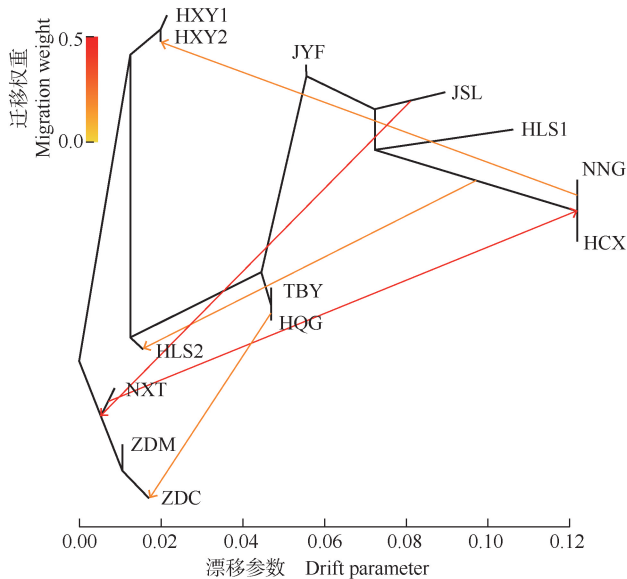
居群 Population	居群间的遗传距离(线上)和遗传分化系数(线下) Genetic distance (above the line) and genetic differentiation coefficient (below the line) between populations												
	HLS1	HLS2	HXY1	HXY2	JSL	HCX	HQG	JYF	NNG	NXT	ZDC	ZDM	TBY
HLS1	—	0.059 0	0.154 3	0.151 3	0.304 3	0.329 1	0.366 5	0.281 1	0.241 3	0.312 7	0.326 2	0.301 2	0.314 8
HLS2	0.009 3	—	0.150 1	0.147 7	0.299 0	0.330 6	0.362 8	0.278 1	0.237 8	0.304 3	0.316 3	0.290 4	0.313 4
HXY1	0.196 2	0.190 4	—	0.063 8	0.313 8	0.327 3	0.383 1	0.223 0	0.260 2	0.340 1	0.342 9	0.308 9	0.343 2
HXY2	0.187 5	0.184 4	0.005 0	—	0.307 6	0.320 1	0.367 8	0.218 3	0.242 7	0.327 2	0.337 7	0.294 8	0.341 1
JSL	0.336 7	0.341 8	0.355 3	0.351 4	—	0.205 2	0.329 8	0.323 5	0.233 3	0.281 1	0.306 7	0.302 7	0.302 1
HCX	0.357 4	0.377 4	0.363 0	0.350 4	0.217 3	—	0.329 7	0.307 3	0.164 5	0.309 5	0.281 3	0.303 3	0.330 7
HQG	0.394 6	0.405 2	0.417 2	0.405 8	0.328 7	0.317 0	—	0.317 4	0.291 7	0.301 7	0.331 6	0.343 5	0.296 8
JYF	0.305 5	0.311 2	0.241 8	0.239 6	0.326 8	0.291 4	0.314 8	—	0.267 7	0.385 8	0.347 2	0.326 9	0.393 8
NNG	0.297 2	0.310 5	0.315 4	0.294 1	0.253 1	0.122 8	0.269 0	0.254 9	—	0.219 0	0.227 5	0.215 3	0.243 9
NXT	0.361 8	0.361 7	0.391 4	0.383 4	0.309 6	0.318 9	0.323 1	0.398 4	0.244 8	—	0.282 2	0.256 2	0.211 8
ZDC	0.283 5	0.287 2	0.319 8	0.311 8	0.269 3	0.127 7	0.222 4	0.275 0	0.000 0	0.238 3	—	0.325 1	0.290 3
ZDM	0.374 0	0.371 7	0.382 6	0.372 7	0.350 2	0.330 9	0.380 6	0.359 0	0.261 5	0.310 0	0.272 3	—	0.310 0
TBY	0.370 5	0.396 8	0.423 0	0.411 0	0.347 9	0.332 6	0.306 6	0.399 9	0.209 1	0.237 7	0.166 6	0.351 1	—

¹⁾ HLS: 浙江省杭州市临安区顺溪坞 Shunxiwu, Lin'an District, Hangzhou City, Zhejiang Province; HXY: 浙江省杭州市西湖区云栖竹径 Bamboo-lined path at Yunqi, Xihu District, Hangzhou City, Zhejiang Province; JSL: 浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区 Lühetang Forest District, Shouchang Forest Farm, Jiande City, Zhejiang Province; HCX: 浙江省杭州市淳安县向阳村 Xiangyang Village, Chun'an County, Hangzhou City, Zhejiang Province; HQG: 安徽省黄山市祁门县牯牛降 Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province; JYF: 浙江省金华市永康市方山口村 Fangshankou Village, Yongkang City, Jinhua City, Zhejiang Province; NNG: 浙江省宁波市宁海县归云洞 Guiyun Cave, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province; NXT: 浙江省宁波市象山县屠家园村 Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province; ZDC: 浙江省舟山市定海区蔡家岙 Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; ZDM: 浙江省舟山市定海区毛陈周 Maochenzhou, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; TBY: 台湾省台北市北投区阳明山 Yangmingshan, Beitou District, Taipei City, Taiwan Province.

基因流分析结果(图 5)表明:浙江省宁波市象山县屠家园村(NXT)、浙江省舟山市定海区毛陈周(ZDM)和浙江省舟山市定海区蔡家岙(ZDC)居群聚为一支;HXY1、HXY2 和 HLS2 等居群聚为另一支;

TBY 和 HQG 居群间及浙江省宁波市宁海县归云洞(NNG)和浙江省杭州市淳安县向阳村(HCX)居群间的遗传关系较近。各居群间存在一定程度的基因交流。在 NNG 居群分化过程中向 HXY2 居群产生了基

因迁移事件;在 NNG 和 HCX 居群分化形成的过程中,NXT 居群与二者存在基因交流,此基因迁移事件的权重最大;并且在 NXT、HLS2 和 ZDC 居群形成的过程中也均受到外界基因迁移事件的影响。



HLS: 浙江省杭州市临安区顺溪坞 Shunxiwu, Lin'an District, Hangzhou City, Zhejiang Province; HXY: 浙江省杭州市西湖区云栖竹径 Bamboo-lined path at Yunqi, Xihu District, Hangzhou City, Zhejiang Province; JSL: 浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区 Lühetang Forest District, Shouchang Forest Farm, Jiande City, Zhejiang Province; HCX: 浙江省杭州市淳安县向阳村 Xiangyang Village, Chun'an County, Hangzhou City, Zhejiang Province; HQG: 安徽省黄山市祁门县牯牛降 Guniujiang, Qimen County, Huangshan City, Anhui Province; JYF: 浙江省金华市永康市方山口村 Fangshankou Village, Yongkang City, Jinhua City, Zhejiang Province; NNG: 浙江省宁波市宁海县归云洞 Guiyun Cave, Ninghai County, Ningbo City, Zhejiang Province; NXT: 浙江省宁波市象山县屠家园村 Tujiayuan Village, Xiangshan County, Ningbo City, Zhejiang Province; ZDC: 浙江省舟山市定海区蔡家岙 Caijia'ao, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; ZDM: 浙江省舟山市定海区毛陈周 Maochenzhou, Dinghai District, Zhoushan City, Zhejiang Province; TBQ: 台湾省台北市北投区阳明山 Yangmingshan, Beitou District, Taipei City, Taiwan Province.

图5 堇叶紫金牛 13 个居群间的基因流分析

Fig. 5 Analysis on gene flow among 13 populations of *Ardisia violacea* (T. Suzuki) W. Z. Fang et K. Yao

3 讨论和结论

影响物种遗传结构和遗传多样性的因子有很多,如生长环境^[20]、分布区域^[21]、种群数量以及繁殖系统特性^[22]等,这些因子会影响物种对环境的适应能力^[23]。本研究发现堇叶紫金牛的群体遗传多样性较低。蔡超男等^[24]在研究濒危植物海南风吹楠(*Horsfieldia hainanensis* Merr.)时发现,由于自身更新

能力弱及受过度人为活动的影响,海南风吹楠群体呈现出遗传多样性低的现状;桃儿七[*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying]^[25]、长序榆(*Ulmus elongata* L. K. Fu et C. S. Ding)^[26]、领春木(*Euptelea pleiosperma* J. D. Hooker et Thomson)^[27]等濒危植物也有类似规律。而对伯乐树(*Bretschneidera sinensis* Hemsl.)的研究发现,伯乐树具有较丰富的遗传多样性^[28],这可能与其分布范围较广、种群数量相对较多有关。相关研究表明:同属的濒危物种遗传多样性通常低于广域分布种,如普陀鹅耳枥(*Carpinus putoensis* Cheng)遗传多样性低于疏花鹅耳枥[*C. laxiflora* (Siebold et Zucc.) Blume]^[29-30],五小叶槭(*Acer pentaphyllum* Diels)遗传多样性低于青榨槭(*A. davidii* Franch.)^[31-32]。本研究中,堇叶紫金牛 13 个居群整体遗传多样性偏低,同属广域分布种朱砂根(*Ardisia crenata* Sims)遗传多样性相对较高^[33-34]。由此推断遗传多样性低可能与濒危植物分布范围小、种群数量少有关,这可能是濒危植物的共有特征。

遗传分化系数是用于衡量居群间遗传分化程度的重要指标^[35]。一般而言,当遗传分化系数大于 0.25 时,群体间遗传分化程度高;遗传分化系数小于 0.05 时,群体间遗传分化程度低^[36]。本研究中,堇叶紫金牛居群间遗传分化系数多数大于 0.25,说明堇叶紫金牛居群间遗传分化程度较高。濒危植物观光木[*Michelia odora* (Chun) Nooteboom et B. L. Chen]和金铁锁(*Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu)的遗传分化系数(分别为 0.375 2 和 0.452 9)^[37-38]与堇叶紫金牛相近。濒危植物遗传分化程度通常高于广域分布种,如红砂[*Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim.]和麻花秦艽(*Gentiana straminea* Maxim.)的遗传分化系数(分别为 0.088 和 0.114)^[39-40]明显低于上述濒危植物,相对于广域分布种,濒危植物的生境片段化现象较为严重,居群间存在地理隔离,受异质化生境的影响而产生分化。

堇叶紫金牛系统发育树和主成分分析结果表明:整体表现为各居群内的样本聚在一起,这主要是因为堇叶紫金牛果实较大,主要通过重力传播,难以传播到较远的地方^[5],因而居群间基因交流相对较少^[41]。同时堇叶紫金牛也存在距离较远的居群间的基因交流,浙江省杭州市临安区顺溪坞 2 个居群(HLS1、HLS2)和浙江省杭州市西湖区云栖竹径 2 个居群(HXY1、HXY2)间的亲缘关系较近,但相较于地理距

离较远的浙江省金华市永康市方山口村(JYF)和浙江省舟山市定海区蔡家岙(ZDC)居群,HLS1、HLS2、HXY1、HXY2居群与浙江省杭州市淳安县向阳村(HCX)、安徽省黄山市祁门县牯牛降(HQG)、浙江省建德市寿昌林场绿荷塘林区(JSL)居群间的地理距离更近,但亲缘关系却相对更远;此外,浙江省宁波市象山县屠家园村(NXT)和ZDC居群均与台湾省台北市北投区阳明山(TBY)居群存在较远的地理距离,但这3个居群间亲缘关系较近;HCX居群与TBY、JYF、ZDC居群有较近的亲缘关系,推测这可能是由鸟类取食并传播其种子所致。吸引鸟类传播的果实(种子)通常具有成熟时颜色鲜艳、体积较小、数量较多、果期长等特点^[42-43],如圆叶相思树(*Acacia cyclops* A. Cunn. ex G. Don)成熟时肉质假种皮橙红色^[44],红豆杉[*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.]肉质假种皮红色^[45],而红色、橙色等颜色对鸟类具有视觉吸引的效果^[46],这些颜色的果实通常是鸟类取食的偏好对象。堇叶紫金牛果实颜色红艳,挂果时间10月至12月,符合鸟类秋冬季取食的偏好特征,因此可能存在鸟类传播扩散种子的现象。

堇叶紫金牛居群面积0.01~0.80 hm²,各居群间地理距离较远,生境片段化现象较为严重,加剧了居群内个体数量的减少,导致居群内近交几率增加,从而使遗传多样性降低。虽然堇叶紫金牛居群间存在较远距离的基因迁移,对居群间遗传多样性的提高具有一定作用,但对于堇叶紫金牛居群衰退的现状难以起到较大的影响。因此,针对堇叶紫金牛遗传多样性降低,应优先保护HQG、NXT和ZDC这3个遗传多样性较高的居群,建立优先保护单元;应制定相应的原地保存与迁地保存策略,减少人为干扰,保护现有野生群体;开展堇叶紫金牛相关的繁育工作,通过人工辅助的手段来维持并扩大居群数量,从而更好地保护其遗传多样性。

参考文献:

- [1] 倪咏咏. 牯牛降发现安徽地理新分布种——堇叶紫金牛[J]. 安徽林业科技, 2018, 44(6): 45.
- [2] 张若蕙. 浙江珍稀濒危植物[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1994: 315-318.
- [3] 刘博文, 王国明, 高浩杰, 等. 舟山本岛堇叶紫金牛所在群落物种组成与结构特征[J]. 浙江林业科技, 2017, 37(4): 54-59.
- [4] 马丹丹, 库伟鹏, 夏国华, 等. 珍稀濒危植物堇叶紫金牛种群结构及动态分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(3): 159-164.
- [5] MA K, LI G Y, ZHU L J, et al. Population structure and distribution patterns of the rare and endangered *Ardisia violacea* (Myrsinaceae) [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33: 72-79.
- [6] 王刘圣丹, 邱丝丝, 夏国华, 等. 堇叶紫金牛的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(6): 615-616.
- [7] 孙英坤, 胡绍庆, 庞基良, 等. 珍稀濒危物种堇叶紫金牛高效快繁体系的建立[J]. 植物学报, 2017, 52(6): 764-773.
- [8] 刘守赞, 叶建丰, 王江铭, 等. 珍稀濒危植物堇叶紫金牛扦插和组培繁殖[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(19): 84-88.
- [9] 张云, 夏国华, 马凯, 等. 遮阴对堇叶紫金牛光合特性和叶绿素荧光参数的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 1940-1948.
- [10] 代英超, 徐奎源, 马凯, 等. 珍稀濒危植物堇叶紫金牛对持续干旱的生理响应[J]. 生态学报, 2015, 35(9): 2954-2959.
- [11] HE J F, ZHAO X Q, LAROCHE A, et al. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding [J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 484.
- [12] 王雪飞, 王悦云, 徐文芬. 基于简化基因组测序的基因分型技术研究两种淫羊藿遗传分化[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 103-109, XXV-XXVI.
- [13] ELSHIRE R J, GLAUBITZ J C, SUN Q, et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species [J]. PLoS ONE, 2011, 6(5): e19379.
- [14] AL-HAJAJ N, PETERSON G W, HORBACH C, et al. Genotyping-by-sequencing empowered genetic diversity analysis of Jordanian oat wild relative *Avena sterilis* [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2018, 65: 2069-2082.
- [15] NIU S Z, SONG Q F, KOIWA H, et al. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and population structure analysis of the tea plant (*Camellia sinensis*) from an origin center, Guizhou plateau, using genome-wide SNPs developed by genotyping-by-sequencing [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19: 328.
- [16] BHATTARAI U, SUBUDHI P K. Identification of drought responsive QTLs during vegetative growth stage of rice using a saturated GBS-based SNP linkage map [J]. Euphytica, 2018, 214: 38.
- [17] MARCOTULI I, GADALETA A, MANGINI G, et al. Development of a high-density SNP-based linkage map and detection of QTL for β -glucans, protein content, grain yield per spike and heading time in durum wheat [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18: 1329.
- [18] 乔岩, 孙佳庆, 魏如倩, 等. GBS技术在植物中的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(8): 47-55.
- [19] MARKERT J A, CHAMPLIN D M, GUTJAHR-GOBELL R, et al. Population genetic diversity and fitness in multiple environments [J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10: 205.
- [20] 谢红江, 李艳锋, 陶炼, 等. 西藏喜马拉雅山荆子生态地理分布及表型遗传多样性研究[J]. 西南农业学报, 2018, 31(2): 259-264.

- [21] 张 瑜, 鄢家俊, 白史旦, 等. 四川野生斑茅居群遗传结构的 SRAP 分析[J]. 中国草地学报, 2015, 37(1): 15-21.
- [22] 胡光明, 夏文娟, 郑 丽, 等. 湖北省通山县野生猕猴桃种质资源调查与果实遗传多样性分析[J]. 植物科学学报, 2021, 39(6): 620-631.
- [23] 李 菁, 张小飞, 陈珏屹, 等. 基于 ISSR 分子标记的西藏杓兰种群遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2020, 40(6): 969-977.
- [24] 蔡超男, 侯勤曦, 慈秀芹, 等. 极小种群野生植物海南风吹楠的遗传多样性研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(5): 547-555.
- [25] 肖 猛, 李 群, 郭 亮, 等. 四川西部濒危植物桃儿七遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生态学报, 2015, 35(5): 1488-1495.
- [26] 袁建国, 朱向涛, 俞 琳. 珍稀濒危植物长序榆遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西南农业学报, 2015, 28(3): 1251-1256.
- [27] 吴 琼, 张 峰, 张谨华, 等. 濒危植物领春木天然群体遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 北方园艺, 2020(13): 77-82.
- [28] 徐刚标, 梁 艳, 蒋 赟, 等. 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.
- [29] 张晓华, 王正加, 李修鹏, 等. 濒危植物普陀鹅耳枥亲缘代遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 山东林业科技, 2011(1): 1-5, 22.
- [30] AHN J Y, LEE J W, LEE M W, et al. Genetic diversity and structure of *Carpinus laxiflora* populations in South Korea based on AFLP markers[J]. Forest Science Technology, 2019, 15(4): 192-201.
- [31] 郝云庆, 罗晓波, 王晓玲. 濒危植物五小叶槭 (*Acer pentaphyllum* Diels) 天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2019, 56(1): 161-166.
- [32] 穆 莹, 张梦璐, 白云海, 等. 基于 EST-SSR 标记的青榨槭天然种群遗传多样性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(2): 57-63.
- [33] 邓素芳, 杨 畅, 赖钟雄. 朱砂根品种资源的 RAPD 分析[J]. 中国农学通报, 2009, 25(10): 63-67.
- [34] 骆 亮, 张文春, 李 龙, 等. 不同居群朱砂根 (*Ardisia crenata*) 的荧光 ISSR 遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(18): 6235-6247.
- [35] 刘声传, 许应芬, 魏 杰, 等. 基于 2b-RAD 技术分析白化茶树品种(系)遗传多样性[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(8): 65-73.
- [36] GE H Y, LIU Y, JIANG M M, et al. Analysis of genetic diversity and structure of eggplant populations (*Solanum melongena* L.) in China using simple sequence repeat markers [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 162: 71-75.
- [37] 徐刚标, 吴雪琴, 蒋桂雄, 等. 濒危植物观光木遗传多样性及遗传结构分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2): 255-261.
- [38] 邱 芬, 雷 瀚, 陈 杰, 等. 云贵地区金铁锁 EST-SSR 遗传多样性分析[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3895-3906.
- [39] 张 旭, 苏世平, 师微柠, 等. 不同居群红砂的遗传多样性分析[J]. 草地学报, 2022, 30(9): 2336-2344.
- [40] 朱田田, 张明惠, 曹后康, 等. 基于 cp DNA 序列和 ISSR 分子标记的甘肃祁连山地区麻花秦艽变异与遗传分化分析[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(9): 691-699.
- [41] 包文泉, 乌云塔娜, 杜红岩, 等. 基于 SSR 标记的西藏光核桃群体遗传多样性和遗传结构分析[J]. 林业科学, 2018, 54(2): 30-41.
- [42] DUAN Q, QUAN R C. The effect of color on fruit selection in six tropical Asian birds[J]. The Condor, 2013, 115(3): 623-629.
- [43] SCHLEUNING M, BLÜTHGEN N, FLÖRCHINGER M, et al. Specialization and interaction strength in a tropical plant-frugivore network differ among forest strata [J]. Ecology, 2011, 92(1): 26-36.
- [44] MOKOTJOMELA T M, HOFFMANN J H, DOWNS C T. The potential for birds to disperse the seeds of *Acacia cyclops*, an invasive alien plant in South Africa [J]. Ibis, 2015, 157: 449-458.
- [45] LI N, TANG N, REN Y H, et al. Effects of forest ropeway construction on bird diversity and its seed dispersal mutualism for endangered *Taxus chinensis*, southeast China [J]. Global Ecology and Conservation, 2022, 38: e02227.
- [46] LARRINAGA A R. Inter-specific and intra-specific variability in fruit color preference in two species of *Turdus* [J]. Integrative Zoology, 2011, 6: 244-258.

(责任编辑: 吴蕊夷)