

基于 ITS2 DNA 序列的雷公藤属药材资源谱系地理学研究

励娜^{1,2}, 王丹^{1,2}, 陈一龙^{1,2}, 姚媛媛³, 张小梅^{1,2*}, 李胜容^{1,2*}

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

2. 重庆市中药研究院 重庆市中药药理学评价工程技术研究中心, 重庆 400065

3. 嘉兴学院生物与化学化工学院, 浙江 嘉兴 314001

摘要: 目的 采用 ITS2 DNA 条形码技术, 研究雷公藤属 3 种药用植物的遗传特性, 揭示其地理分布格局的形成原因。方法 收集雷公藤属植物 28 个居群 223 份样本, 提取基因组 DNA, 扩增 ITS2 基因序列并测序, 并进行遗传多样性分析, 绘制失配分布曲线检测居群历史动态变化情况, 估算雷公藤属种间、种内群体间和群体内的差异及遗传分化系数。结果 雷公藤属 28 个居群 223 份样本共检测到 12 个碱基突变位点, 构成 10 个单倍型。昆明山海棠 *Tripterygium hypoglaucum* 共有 7 个单倍型, H2~H7 为特有单倍型; 雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 共有 4 个单倍型, H8 为特有单倍型; 东北雷公藤 *Tripterygium regelii* 共有 3 个单倍型, 无特有单倍型; H1 为 3 个物种间的共有单倍型, H9 和 H10 为雷公藤和东北雷公藤共有单倍型。群体遗传多样性分析显示, 雷公藤属具有较高的单倍型多态性 ($H_d=0.615\pm0.024$) 和核苷酸多态性 [$P_i=(9.47\pm0.58)\times10^{-3}$]。群体遗传结构分析显示, 雷公藤属的变异主要存在于物种之间 (76.14%), 种内群体间和群体内的变异分别为 11.42%、12.44%。群体动态历史分析表明, 雷公藤属、雷公藤和东北雷公藤曾经历过扩张, 而昆明山海棠未经历过扩张。结论 雷公藤属及其属下的昆明山海棠和雷公藤的遗传多样性水平较高, 而东北雷公藤遗传多样性水平较低。雷公藤属植物在第 4 纪冰期时, 将中国西南、华中和华东的部分地区作为冰期避难所, 冰期后以冰期避难所为中心向四周扩散, 形成当前雷公藤属植物的分布格局。

关键词: 雷公藤属; 昆明山海棠; 雷公藤; 东北雷公藤; ITS2 序列; 谱系地理学; 遗传特性

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)17-5476-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.024

Phylogeography of *Tripterygium* inferred based on ITS2 DNA sequence variation

LI Na^{1,2}, WANG Dan^{1,2}, CHEN Yi-long^{1,2}, YAO Yuan-yuan³, ZHANG Xiao-mei^{1,2}, LI Sheng-rong^{1,2}

1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing Engineering Research Center of Pharmaceutical Evaluation of Chinese Medicine, Chongqing 400065, China

3. College of Biological, Chemical Science and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China

Abstract: Objective To study the genetic characteristics and geographical distribution of three species of the genus *Tripterygium* by ITS2 DNA barcoding technique. **Methods** A total of 223 samples from 28 populations of *Tripterygium* were collected. The genomic DNA extraction and ITS2 gene amplification and sequencing were performed on the above samples. Genetic diversity was analyzed by calculating haplotype diversity and nucleotide diversity. The dynamic change of social history was detected by drawing the curve of mismatch distribution. Based on the above data analysis, the differences among species, populations and populations, and the coefficient of genetic differentiation between species and populations were estimated. **Results** A total of 12 base mutation sites were detected in 223 samples from 28 populations of *Tripterygium*, which constituted 10 haplotypes. There were seven haplotypes in *Tripterygium. hypoglaucum*, and H2—H7 were unique haplotypes. There were four haplotypes in *T. wilfordii*, and H8 was a unique haplotype. There were three haplotypes in *T. regelii*. Among the three species, H1 is the haplotype of three species, H9 and H10 are the haplotypes of *T. wilfordii* and *T. regelii*. The analysis of population genetic diversity showed that *Tripterygium* had high haplotype and nucleotide polymorphism [$H_d = 0.615 \pm 0.024$, $P_i = (9.47 \pm 0.58) \times 10^{-3}$]. The analysis of population genetic structure showed that the variation of *Tripterygium* mainly existed among species (76.14%), and the variation of intraspecies and

收稿日期: 2022-02-06

基金项目: 国家重大新药创制科技专项 (2017ZX09101002); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目 (cstc2017jcyjAX0001, cstc2018jcyjAX0142); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2017shms-zdyfX00012)

作者简介: 励娜, 主任中药师, 从事中药资源、质量控制、中药制剂、中药炮制工艺及机制研究。E-mail: lina1281@163.com

***通信作者:** 张小梅, 主任中药师, 从事中药资源与物质基础研究、中药品种评价、中药新药研究。E-mail: 605050963@qq.com

李胜容, 主任药师, 从事中药资源与质量评价、中药新药研究开发。E-mail: 1079639273@qq.com

intrapopulation was 11.42% and 12.44%, respectively. The population dynamic analysis showed that *Tripterygium*, *T. wilfordii* and *T. regelii* had experienced expansion, but *T. hypoglaucum* had not. **Conclusion** The genetic diversity level of *Tripterygium*, *T. hypoglaucum* and *T. wilfordii* are higher than that of *T. regelii*. *Tripterygium* used parts of Southwest China, Central China, and East China as refuges during the Quaternary ice age. After the ice age, *Tripterygium* spread around the refuge, forming the current distribution pattern.

Key words: *Tripterygium*; *Tripterygium hypoglaucum* (Lévl.) Hutch.; *Tripterygium wilfordii* Hook; *Tripterygium regelii* Sprague et Takeda; ITS2 sequence; phylogeography; genetic characteristics

第 4 纪冰期的气候震荡显著改变了北半球温带地区的大多数物种的地理分布, 产生了不同程度的范围扩展和收缩, 影响了种群内部和种群间遗传变异的地理格局^[1-2]。近年, 基于 DNA 条形码技术的分子谱系地理学是国际上研究居群遗传分化进化历史的热点和亮点^[3]。分子谱系地理学研究技术在药用植物遗传多样性、历史进化、地理分布格局历史成因和资源保护等方面的研究中发挥着日益重要的作用^[4-5]。ITS2 基因序列常用于植物属间、种间甚至居群间的系统关系探究, 对于植物居群的动态结构、历史事件的发生过程有清晰的认识, 能全面的反应居群的进化历史^[6-7]。

我国传统药用植物昆明山海棠 *Tripterygium hypoglaucum* (Lévl.) Hutch. 和雷公藤 *T. wilfordii* Hook 均属于卫矛科 (Celastraceae) 雷公藤属 *Tripterygium* L. 植物, 同属植物还包括东北雷公藤 *T. regelii* Sprague et Takeda, 其中前两者广泛分布于

我国长江中、下游以南及西南地区, 后者主要分布于我国东北地区^[8]。作为自身免疫性疾病临床常用中药, 昆明山海棠与雷公藤植物药材目前主要采自野生, 经过近 30 年的开发利用和适生环境被侵占, 呈现资源锐减、供应严重匮乏等现象, 甚至部分地区面临资源枯竭的危险^[9-10]。因此, 本研究旨在通过分析我国雷公藤属植物 28 个居群 223 份个体的 ITS2 的序列变异, 阐明雷公藤属植物遗传特性及地理分布格局的历史成因, 以期为该属植物的资源保护策略的制定提供一定的参考。

1 材料

1.1 药材

本研究共收集 3 种雷公藤属植物 28 个居群 223 份样本, 经重庆市中药研究院瞿显友研究员分别鉴定为昆明山海棠 *T. hypoglaucum* (Lévl.) Hutch.、雷公藤 *T. wilfordii* Hook 和东北雷公藤 *T. regelii* Sprague et Takeda 的干燥根。具体信息见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

编号	品种	产地	海拔/m	经度	纬度
S1	昆明山海棠	四川米易普威	2226	E101°59'31"	N27°03'33"
S2		四川米易横山	1824	E102°00'40"	N26°59'26"
S3		四川德昌	1772	E102°08'21"	N27°23'44"
S4		四川冕宁林里	1624	E102°11'57"	N28°22'43"
S5		四川冕宁石龙	1840	E102°12'14"	N28°31'21"
S6		云南南华	2507	E101°01'23"	N25°19'30"
S7		云南大理	2450	E100°07'31"	N25°41'59"
S8		云南南涧	1696	E100°32'51"	N24°48'37"
S9		云南保山	2280	E99°06'58"	N25°07'30"
S10		贵州雷山	1160	E108°13'43"	N26°25'07"
S11		贵州剑河	811	E108°33'18"	N26°37'58"
S12		贵州印江	873	E108°36'48"	N27°56'27"
S13		重庆武隆	1589	E107°42'24"	N29°30'23"
S14		重庆石柱	1580	E108°23'01"	N30°13'23"
S15		重庆江津	1164	E106°26'06"	N28°36'21"
S16		湖南南岳	764	E112°38'18"	N27°14'06"
S17		湖南新宁	1094	E110°54'04"	N26°26'07"
S18		湖南武冈	1415	E110°37'21"	N26°39'02"
S19	雷公藤	湖北利川	738	E108°39'50"	N30°25'25"
S20		湖北通城	152	E113°45'37"	N28°07'20"
S21		浙江龙泉	1208	E118°58'14"	N28°05'21"
S22		江西湾里	168	E115°43'10"	N28°48'29"
S23		江西婺源	60	E117°32'45"	N29°05'40"
S24		江西修水	152	E114°02'41"	N28°55'40"
S25	东北雷公藤	吉林通化	650	E126°04'26"	N41°34'02"
S26		吉林江源	1024	E126°42'09"	N41°55'39"
S27		吉林临江	739	E126°55'20"	N41°50'11"
S28		吉林池北	1090	E128°10'59"	N42°11'07"

1.2 试剂与仪器

植物基因组 DNA 试剂盒, 天根生化科技有限公司; TIANGel Midi 纯化试剂盒, 天根生化科技有限公司; UV-1100 SPECTROPHOTOMETER, MAPADA 有限公司; BP121S 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; AEG-45SM 型电子天平, 日本岛津公司; BJ-100 型多功能粉碎机, 德清拜杰电器有限公司; KQ250DB 型数控超声波清洗器, 巩义市予华仪器有限公司; HH-S24 型恒温水浴锅, 金坛梅香仪器有限公司; SCIENTZ-48 DNA 提取研磨机; 9700 GeneAmp PCR 仪, Applied Biosystems 公司; ABI 3730XL 测序仪, Applied Biosystems 公司。

2 方法

2.1 DNA 提取、扩增和测序

根据植物基因组 DNA 试剂盒说明书提取上述 28 个居群 223 份雷公藤属植物样本总基因, 参考 Chen 等^[1]操作步骤进行 PCR 扩增。ITS2 引物序列: 正向为 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'; 反向为 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。采用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳, 并使用 TIANGel Midi 试剂盒进行纯化。使用 ABI 3730XL 测序仪对纯化后的样品进行测序。

2.2 遗传多样性分析

使用 DnaSP v5 软件确定雷公藤属 3 个物种 28 个居群 ITS 数据的单倍型, 并统计多态位点和信息位点的数目, 计算群体单倍型多样性 (haplotype diversity, H_d)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, P_i)。

2.3 群体遗传结构分析

使用 PERMUT 软件计算雷公藤属的遗传分化参数 (G_{st} 、 N_{st}), 并检验差异的显著性。使用 Arlequin3.5 软件进行分子方差分析 (AMOVA) 估算属内种间、种内群体间和群体内的差异, 以及种间和群体间遗传分化系数。

2.4 中性检验

使用 DnaSP v5 软件计算中性检验统计值 Tajima's D (D 值) 和 Fu's F_s (F 值)。中性学说认为分子水平上的突变大多是中性或接近中性, 对生物体的生存不存在任何有利或不利影响, 且不受自然选择的影响。突变是自然种群随机遗传漂变的结果, 因此, 核酸替换率只与它的突变率相关, 它们概率是相等的。通过检验来判断这些位点是否符合中性进化模式。如果 D 值为负值, 说明种群内存在

大量低频率的等位基因, 暗示着种群曾经经历过扩张和或净化选择; 如果 D 值为正, 则说明种群内中等频率的等位基因较多, 那么种群可能经历过瓶颈效应和或平衡选择。 F 值亦如此。但是 D 值反映的是群体动态的古老事件, 而 F 值反映的则是近期发生的群体动态。

2.5 失配分析

失配分布是检测群体大小变化的一种方法, 可以推测群体是否经历过快速扩张事件。失配分布检验主要是将种群中的任意两个序列进行比较进而得到两个序列间差异的分布情况, 其结果可用于计算雷公藤属各水平类群在历史上的种群动态。通过观察值与模拟值间的离差平方和和反映拟合曲线平滑度的 H_{RAG} 值, 可以判断雷公藤属种群是否经历过种群扩张或是瓶颈效应。因为种群大小如果长期保持稳定的话, 那么它的分布曲线应该出现至少 2 个峰值, 而经历过快速扩张的种群则会呈现为泊松分布。用 DnaSP v5 软件绘制失配分布曲线, 用 Arlequin 3.5 计算相关参数。

2.6 单倍型网络图分析

以独子藤 *Celastrus monospermus* Roxb. 作为外类群, 利用 Network 构建基于 Median joining 算法的单倍型网络图, 并对该图进行手工调整。

2.7 单倍型系统发育树

使用 Modeltest 3.7 软件对 ITS2 单倍型序列进行计算, 以得到 DNA 序列替代模型的最佳模型。利用 MrBayes 3.1.2 软件对 ITS2 序列数据进行贝叶斯分析, 构建以独子藤为外类群的雷公藤属的单倍型系统树。

3 结果与分析

3.1 ITS2 序列变异分析和单倍型分布

雷公藤属 3 个物种 28 个群体 223 份样本成功扩增出 223 bp ITS2 序列, 共检测到 12 个变异位点 (Variable/polymorphic sites), 全为碱基突变, 共有 11 个信息位点 (parsimony informative sites) (表 2)。12 个变异位点构成了 10 个单倍型 (H1~H10)。昆明山海棠共有 7 单倍型, 其中 6 个为特有单倍型 (H2~H7); 雷公藤共有 4 单倍型, 其中 1 个为特有单倍型 (H8); 东北雷公藤共有 3 单倍型, 无特有单倍型; 3 个物种之间, H1 是 3 个物种共有单倍型, H9 和 H10 为雷公藤和东北雷公藤共有单倍型; 除开 H1, 东北雷公藤和昆明山海棠之间、昆明山海棠和雷公藤之间再无其他共有单倍型 (表 3)。

表 2 雷公藤属 10 种单倍型和 12 个变异位点
Table 2 Ten haplotypes and 12 variant sites of *Tripterygium*

类型	变异位点											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H1	G	G	A	A	G	T	C	A	T	C	C	T
H2	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—
H4	A	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—
H5	—	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—
H6	—	—	—	—	—	C	T	—	—	—	—	—
H7	—	—	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—
H8	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H9	—	—	—	T	—	—	—	G	C	T	—	A
H10	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—

表 3 雷公藤属物种的单倍型多态性、核酸多态性和单倍型分布

Table 3 Haplotype polymorphism, nucleic acid polymorphism and haplotype distribution in *Tripterygium*

编号	单倍型数量	H_d	$P_i/(\times 10^{-3})$	单倍型种类及频次
S01	13	0.410±0.154	1.95±0.90	H1(10)、H2(2)、H3(1)
S02	12	0.485±0.106	2.17±0.48	H1(8)、H2(4)
S03	9	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(9)
S04	12	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(12)
S05	7	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(7)
S06	10	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(10)
S07	11	0.327±0.153	2.94±1.38	H1(9)、H4(2)
S08	11	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(11)
S09	11	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(11)
S10	11	0.000±0.000	0.00±0.00	H5(11)
S11	11	0.000±0.000	0.00±0.00	H5(11)
S12	5	0.000±0.000	0.00±0.00	H5(5)
S13	12	0.485±0.106	2.17±0.48	H1(4)、H2(8)
S14	13	0.000±0.00	0.00±0.00	H5(13)
S15	12	0.409±0.133	1.83±0.60	H1(3)、H5(9)
S16	12	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(12)
S17	6	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(6)
S18	3	1.000±0.272	5.98±1.99	H1(1)、H6(1)、H7(1)
S19	6	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(6)
S20	8	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(8)
S21	10	0.000±0.000	0.00±0.00	H8(10)
S22	15	0.590±0.077	12.13±1.55	H1(8)、H9(6)、H10(1)
S23	10	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(10)
S24	9	0.000±0.000	0.00±0.00	H1(9)
S25	10	0.000±0.000	0.00±0.00	H9(10)
S26	18	0.000±0.000	0.00±0.00	H9(18)
S27	20	0.468±0.104	10.36±2.12	H1(5)、H9(14)、H10(1)
S28	18	0.000±0.000	0.00±0.00	H9(18)

3.2 群体遗传多样性分析

雷公藤属 28 个群体共检测到 12 种单倍型，每个群体的单倍型及个体数见表 3。在 28 个群体中，8 个群体具有单倍型多态性，其中 4 个群体具有 2 种单倍型，4 个群体具有 3 种单倍型，无群体具有 3 个以上的单倍型。如表 4 所示，雷公藤属具有较高的单倍型多态性 ($H_d=0.615 \pm 0.024$) 和核苷酸多态性 [$P_i=9.47 \pm 0.58$] ($\times 10^{-3}$)，

在物种水平上 3 个物种的多态性水平均小于雷公藤属多态性水平， H_d 的变化范围为 (0.170±0.060) (东北雷公藤) ~ (0.506±0.069) (雷公藤)， P_i 的变化范围为 (2.22±0.21) $\times 10^{-3}$ (昆明山海棠) ~ (6.26±1.51) $\times 10^{-3}$ (雷公藤)。群体水平上， H_d 的变化范围为 (0.327±0.153) (大理) ~ (1.000±0.272) (武冈)， P_i 的变化范围为 (1.83±0.60) $\times 10^{-3}$ (江津) ~ (12.13±1.55) $\times 10^{-3}$ (南昌)。

表 4 雷公藤属群体的单倍型多态性、核酸多态性和单倍型分布

Table 4 Haplotype polymorphisms, nucleic acid polymorphisms, and haplotype distribution in *Tripterygium*

样本	单倍型数量	H_d	$P_i/(\times 10^{-3})$
昆明山海棠	187	0.448 ± 0.035	2.22 ± 0.21
雷公藤	52	0.506 ± 0.069	6.26 ± 1.51
东北雷公藤	66	0.170 ± 0.060	3.90 ± 1.36
雷公藤属	223	0.615 ± 0.024	9.47 ± 0.58

3.3 群体遗传结构

AMOVA 分析显示,雷公藤属的变异主要存在于物种之间(76.14%),种内群体间和群体内的变异分别为 11.42%、12.44%。物种水平上,雷公藤的变异在群体间

和群体内差异不大,分别为 47.66%和 52.34%;昆明山海棠的变异主要存在于群体间(65.54%),群体内的变异为 34.46%;东北雷公藤的变异主要存在于群体内(76.64%),群体间的变异为 23.36%(表 5)。

表 5 雷公藤属分子变异分析 (AMOVA)

Table 5 Molecular variation analysis of *Tripterygium* (AMOVA)

样本	变异来源	自由度	平方和	变异百分比/%	F 值
雷公藤属	物种间	2	211.059	76.14	$F_{CT}=0.761\ 36$
	种内群体间	25	54.112	11.42	$F_{SC}=0.478\ 64$
	群体内	277	55.688	12.44	$F_{ST}=0.875\ 58$
东北雷公藤	群体间	3	6.308	23.36	
	群体内	62	21.950	76.64	$F_{ST}=0.233\ 61$
昆明山海棠	群体间	18	31.142	65.54	$F_{ST}=0.655\ 44$
	群体内	168	14.805	34.46	
雷公藤	群体间	4	16.663	47.66	$F_{ST}=0.476\ 56$
	群体内	47	18.933	52.34	

3.4 群体动态历史分析

分别在属水平、物种水平进行 D 值和 F 值中性检验(表 6),结果显示 D 值和 F 值的正负不一,均未到达显著水平,因此不能拒绝中性假说。说明雷公藤属在属水平和物种水平均未经历过群体扩张或瓶颈事件。

分别对雷公藤属以及 3 个物种进行了失配分布检验(表 6)。雷公藤属水平上,SSD=0.072 78, $P=0.19$, $H_{RAG}=0.156\ 17$, $P=0.32$,不能拒绝扩张假说。物种水平上,雷公藤和东北雷公藤的 SSD 和 H_{RAG} 的 P 值都不显著,不能拒绝扩张假说;而昆明山海棠的 SSD 的 P 值显著, H_{RAG} 的 P 值不显著,从 SSD 的结果看需要拒绝扩张假说,而从 H_{RAG} 的结果看,不能拒绝扩张假说,结果不一致。另外从失配分布曲线看,雷公藤属、雷公藤和东北雷公藤的观察曲线为双峰,而昆明山海棠呈现的是比较完整的单峰分布,说明雷

公藤属、雷公藤和东北雷公藤曾经经历过扩张,而昆明山海棠未经历过扩张(图 1)。

中性检验、失配分析的曲线以及 SSD 和 H_{RAG} 分析对雷公藤属、昆明山海棠、雷公藤和东北雷公藤的群体动态结果不一致,可能是由于 ITS2 一个片段的信息位点太少导致,需要进一步增加片段进行分析。

3.5 单倍型网络图分析

如图 2 所示,单倍型网络图分析显示雷公藤属的 10 个单倍型构成一个星状的拓扑结构,其中单倍型 H1 和 H5 处于星状结构的中心,与其他单倍型具有最近的亲缘关系,说明 H1 和 H5 是最原始的单倍型。根据星状的拓扑结构,雷公藤属 10 个单倍型大致可以分成 3 个支系,其中 2 个支系分别以 H1 和 H5 为祖先单倍型, H9 单独成为一个分支构成一个支系。

结合单倍型分布图分析发现,单独为一个支系的单倍型 H9 为东北雷公藤独有单倍型, 4 个东北雷公

表 6 雷公藤属中性检验和失配分析结果

Table 6 *Tripterygium* neutrality test and mismatch analysis results

样本	SSD	P 值	H_{RAG}	P 值	F 值	P 值	D 值	P 值
雷公藤属	0.072 78	0.19	0.156 2	0.32	0.812 36	0.692	0.249 73	0.638
雷公藤	0.040 26	0.14	0.160 9	0.49	1.927 54	0.850	-0.259 58	0.474
东北雷公藤	0.033 03	0.06	0.717 6	0.67	1.917 66	0.819	-0.748 92	0.249
昆明山海棠	0.008 70	0.04	0.152 9	0.11	-3.201 47	0.070	-0.825 29	0.245

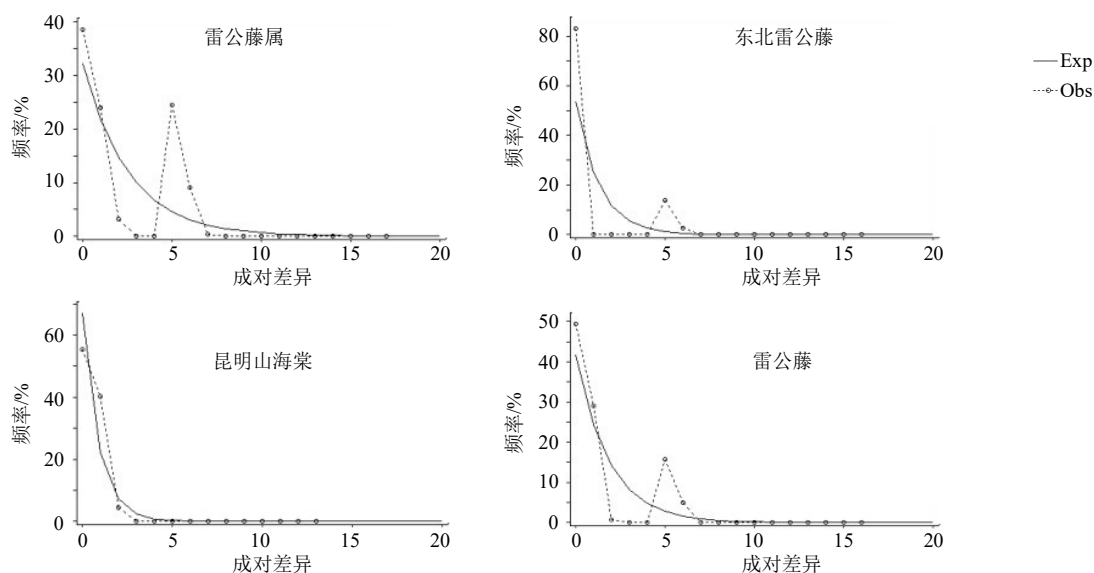


图 1 雷公藤属失配分布分析

Fig. 1 *Tripterygium* mismatch distribution analysis

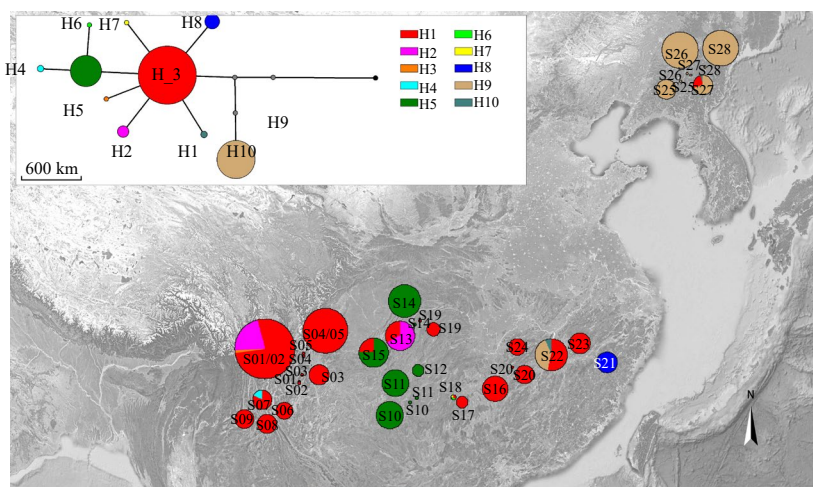


图 2 雷公藤属单倍型网络局部图

Fig. 2 Network diagram of *Tripterygium* haplotype

藤群体均有该单倍型，因此 H9 的分布与东北雷公藤的分布范围一致，在我国东北部。以 H5 为祖先单倍型的支系，主要分布在云南北部、贵州、重庆南部和湖南西部地区，该支系为昆明山海棠所独有。剩余单倍型的以 H1 为祖先单倍型，雷公藤属的 3 个物种都有该支系的单倍型，分布范围最为广阔。

3.6 单倍型系统发育树

使用贝叶斯法构建的雷公藤属系统发育树见图 3，该系统树中多数分支的支持率很低，其中 H5、H4 和 H6 构成的分支的支持率超过 0.5，与单倍型网络图结果相似。系统树中，H9 依然是单独够成一支，与单倍型网络图的结果也类似。与单倍型网

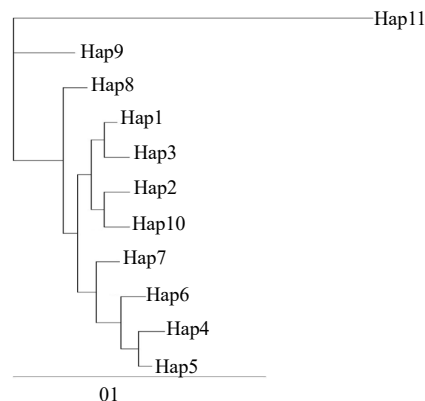


图 3 雷公藤属单倍型系统发育树

Fig. 3 *Tripterygium* haplotype phylogenetic tree

络图结果不一样的是在系统发育树中剩余单倍型并未独聚为一支,而是与 H5、H4 和 H6 一起构成一个支持率为 0.53 的分支,而 H7 和 H8 未与他们聚在一起。

4 讨论

4.1 群体遗传多样性

在属水平上,雷公藤属具有较高的遗传多样性, H_d 为 0.615 ± 0.024 , P_i 为 $(9.47 \pm 0.58) \times 10^{-3}$;物种水平上,雷公藤属 3 个物种遗传多样性水平具有一定的差异,其中 H_d 由高到低依次为雷公藤 (0.506 ± 0.069)、昆明山海棠 (0.448 ± 0.035)、东北雷公藤 (0.170 ± 0.060);与雷公藤属属水平遗传多样性相比,物种水平的遗传多样性较低。雷公藤属及其属下 2 个种昆明山海棠和雷公藤的遗传多样性水平较高,而东北雷公藤遗传多样性水平较低。东北雷公藤遗传水平低的原因可能有 2 种,一个是第 4 纪冰期时,东北雷公藤已经扩散到我国东北地区,在冰期时群体收缩由于严重的遗传漂变导致群体遗传多样性下降。第 2 个是东北雷公藤在扩散到东北时,由于建群者效应导致当前的群体遗传多样性水平较低。

4.2 群体遗传结构

群体遗传结构方面,雷公藤属 3 个物种群体水平的遗传多样性都很低。属水平上,28 个群体中只有 8 个群体具有遗传多样性。物种水平上,5 个雷公藤群体只有 1 个群体具有遗传多样性,19 个昆明山海棠群体只有 6 个群体具有遗传多样性,4 个东北雷公藤群体只有 1 个群体具有遗传多样性。AMOVA 分析显示,雷公藤属的变异主要存在于物种之间 (76.14%),雷公藤属物种间分化显著。物种水平上,雷公藤的变异在群体间和群体内差异不大;昆明山海棠的变异主要存在于群体间;东北雷公藤的变异主要存在于群体内。Hamrick 等^[12]的研究认为,在物种水平上植物群体遗传多样性水平主要收到系统分类地位、分布范围、生活型、繁育系统和种子散播机制等因素的影响,群体水平上主要受到繁育系统、分布范围、生活史、分类地位和种子的散播机制等因素的影响。根据 Hamrick 和 Godt 理论,多年生、异交为主、风媒或水媒扩散种子的植物群体间的分化程度较低,相反长寿的、自交为主的植物群体间的分化程度较高。

4.3 冰期避难所

气候波动对植物地理分布格局的影响非常大,

第 4 纪冰期是对当前我国植物地理分布格局影响最大的一次历史气候^[13-14]。在第 4 季冰期时,亚洲、美洲和欧洲都有明显的大陆冰川,但是在我国范围内没有明显的大陆冰川,只有部分山地冰川^[15]。冰期避难所是指在冰期尤其是盛冰期时,许多物种分布范围收缩后生存下来的区域^[16]。避难所区域的群体比其他区域群体的遗传多样性高,根据这一特性及雷公藤属单倍型分布格局,认为在第 4 纪冰期时,云南北部及四川南部的横断山脉、重庆的大巴山脉、湖南南部的南岭和江西北部的庐山是雷公藤属植物的冰期避难所。

云南北部及四川南部地处我国横断山脉,横断山脉地区位于青藏高原东南部外围,地质构造上十分活跃。该区域具有复杂的种子植物区系和丰富的特有种,是潜在的第 4 季冰期避难所^[17]。大巴山脉具有山高、坡陡、谷深的地貌特点。秦巴山地是北部冷空气南下的重要屏障,使得这一地区保存有第 3 纪植物最具丰富性和完整性^[18]。周先容等^[19-20]研究指出大巴山、武陵山、神农架地区具有较大比例的古特有种和珍稀濒危物种,无遗是古植物区系的重要避难所。南岭地区是热带和亚热带的过度地区,长期保持湿热的气候环境,对中生代和新生代的植物进化起着重要的作用。该区域中国特有种在总种数中占比高达 59.9%,也是动植物第 4 纪冰期的避难所。周秉根等^[21-22]对扬子鳄的研究认为第四纪冰期是华中地区的中低山系(包括黄山、庐山、九华山和天目山等)不具备发育冰川的条件,而是季风性冰缘环境且为温暖带气候,很可能是第 4 纪冰期避难所。

结合雷公藤属植物单倍型分布图和单倍型网络图分析发现,雷公藤属植物具有中国西南至华中,然后到华东,最后扩散到东北的历史迁移路线。笔者认为,雷公藤属植物在第 4 纪冰期时以云南北部及四川南部的横断山脉、重庆的大巴山脉、湖南南部的南岭和江西北部的庐山作为冰期避难所,冰期后以冰期避难所为中心向四周扩散,形成当前雷公藤属植物的分布格局。

4.4 资源状况分析

雷公藤属药用植物资源目前主要来自野生,其中昆明山海棠分布面积较雷公藤和东北雷公藤更广,野生资源较为丰富,在四川凉山等地成片生长,但由于过度开采及存在大量紫茎泽兰恶性竞争其适生环境,其蕴藏量已急剧减少。雷公藤多以散生为

主,在本次实地取样过程种未见大面积群落,一个地方仅有几株、几十株,重复取样具有一定困难。且雷公藤喜阴湿,但需要一定阳光,郁闭度稍高,长势就变弱。现华东地区严禁砍伐木材后,山区森林郁闭度增高,雷公藤长势渐弱,进一步不利于雷公藤的生长繁殖。东北雷公藤的群落主要集中在长白山地区。由于其尚未开发利用,野生资源还未被破坏,但分布区较小,资源蕴藏总量不多。

综上所述,基于 ITS2 基因序列对雷公藤属药用植物谱系地理学研究结果表明,该属植物具有较高的遗传多样性,其下的 3 个物种群体水平的遗传多样性都很低。在第 4 纪冰期时以云南北部及四川南部的横断山脉、重庆的大巴山脉、湖南南部的南岭和江西北部的庐山作为冰期避难所,冰期过后以冰期避难所为中心向四周扩散,形成当前雷公藤属植物的分布格局。资源现状分析提示雷公藤属药用植物野生资源匮乏,后续课题组将就此进一步提出雷公藤属药用植物资源保护和可持续发展策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li Q E, Guo X, Niu J F, *et al.* Molecular phylogeography and evolutionary history of the endemic species *Corydalis hendersonii* (Papaveraceae) on the Tibetan Plateau inferred from chloroplast DNA and ITS sequence variation [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 436.
- [2] Hewitt G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages [J]. *Nature*, 2000, 405(6789): 907-913.
- [3] 卓维, 刘艳, 白娟, 等. 基于 nrDNA ITS 序列的榧树属植物鉴定及亲缘关系分析 [J]. *分子植物育种*, 2021, 19(11): 3579-3587.
- [4] 李菁, 向婷婷, 许成, 等. 分子谱系地理学在药用植物基因水平的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(8): 1243-1246.
- [5] 刘晓光, 黄璐琦, 袁庆军, 等. 基于分子谱系地理学的药用植物核心种质构建 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(5): 692-698.
- [6] 杨俊誉, 魏世杰, 苏代发, 等. 云南黄毛草莓的 nrDNA ITS 和 cpDNA psbA-trnH 序列分子鉴定及进化特征分析 [J]. *南方农业学报*, 2020, 51(4): 748-757.
- [7] 张雪梅, 何兴金. 青藏高原特有植物青海当归的谱系地理学初探 [J]. *植物分类与资源学报*, 2013, 35(4): 505-512.
- [8] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第六卷 第一分册, 蕨类植物门) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 178.
- [9] 王特, 李兆福, 李涛, 等. 昆明山海棠治疗类风湿关节炎作用机制的研究进展 [J]. *风湿病与关节炎*, 2019, 8(8): 60-63.
- [10] 徐娥, 任慧珠. 小剂量雷公藤多甙对早期糖尿病肾病患者的临床疗效观察 [J]. *实用糖尿病杂志*, 2020, 16(3): 57-58.
- [11] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [12] Hamrick J L, Godt M J W. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources* [M]. Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 1990.
- [13] Qiu Y X, Fu C X, Comes H P. Plant molecular phylogeography in China and adjacent regions: Tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2011, 59(1): 225-244.
- [14] Hewitt G M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004, 359(1442): 183-195.
- [15] Zhao C, Wang C B, Ma X G, *et al.* Phylogeographic analysis of a temperate-deciduous forest restricted plant (*Bupleurum longiradiatum* Turcz.) reveals two refuge areas in China with subsequent refugial isolation promoting speciation [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2013, 68(3): 628-643.
- [16] 沈浪, 陈小勇, 李媛媛. 生物冰期避难所与冰期后的重新扩散 [J]. *生态学报*, 2002, 22(11): 1983-1990.
- [17] 陈冬梅, 康宏樟, 刘春江. 中国大陆第四纪冰期潜在植物避难所研究进展 [J]. *植物研究*, 2011, 31(5): 623-632.
- [18] 赵芳, 张百平, 朱连奇, 等. 秦巴山地垂直带谱结构的空分异与暖温带—亚热带界线问题 [J]. *地理学报*, 2019, 74(5): 889-901.
- [19] 周先容, 尚进, 陈发波, 等. 巴山榧树及近缘种的 psbA-trnH 序列分析 [J]. *西部林业科学*, 2015, 44(1): 16-21.
- [20] 周先容, 汪建华, 尚进, 等. 金佛山喀斯特山地巴山榧树灌丛群落优势灌木种群的种间关系 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2016, 38(9): 88-94.
- [21] 周秉根, 卢晓. 扬子鳄如何渡过第四纪冰期 [J]. *华中师范大学学报: 自然科学版*, 1994, 2: 260-262.
- [22] 周秉根, 李刚, 姚敏, 等. 九华山第四纪冰缘地貌与古环境分析 [J]. *安徽师大学报: 自然科学版*, 1994, 17(2): 48-53.

[责任编辑 时圣明]